



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

# **MUTAGÉNESIS LETAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C**

TESIS DOCTORAL

Ana María Ortega Prieto

Madrid, 2014





Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

# **MUTAGÉNESIS LETAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C**

Memoria presentada por la Licenciada en Biología D.<sup>a</sup> Ana María Ortega Prieto, adscrita al Departamento de Biología Molecular, para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el “Centro de Biología Molecular Severo Ochoa”, bajo la co-dirección del Dr. Esteban Domingo Solans y de la Dra. Celia Perales Viejo y financiado por una beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Madrid, Julio de 2014.





El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el “Centro de Biología Molecular Severo Ochoa” por la Licenciada D.<sup>a</sup> Ana María Ortega Prieto bajo la co-dirección del Dr. Esteban Domingo Solans y de la Dra. Celia Perales Viejo.

Fdo. Prof. Esteban Domingo Solans y Dra. Celia Perales Viejo.

Madrid, Julio de 2014.



**A mi madre, Paula y Jose.**



***“Eppur si muove”***  
Galileo Galilei



## Agradecimientos.

Me gustaría en primer lugar dar las gracias al Dr. Esteban Domingo por recibirme en su laboratorio y darme la oportunidad de hacer la Tesis Doctoral bajo su dirección. Muchas gracias por apoyarme cuando lo he necesitado, por tantas charlas en tu despacho y por hacerme ver el lado positivo de cada resultado. En definitiva por ayudarme en mi desarrollo como científica y a ser lo que soy ahora. También gracias a la Dra. Celia Perales por su dirección y supervisión durante estos años.

Me gustaría darle GRACIAS con mayúsculas a la Dra. Ana Grande-Pérez por confiar en mí desde el principio, sin ti yo no estaría aquí y nada de esto hubiese sido posible. También por acogerme en su laboratorio siempre que los experimentos lo han requerido y ayudarme a realizar las medidas de tantos niveles de nucleótidos.

Gracias al Dr. Matthias Götte de la Universidad de McGill por permitir que formara parte de su equipo durante unos meses y enseñarme tantas cosas de la NS5B. Y por supuesto a todas y cada una de las personas que me acompañaron durante esa etapa y que me enseñaron no sólo ciencia sino también inglés y a disfrutar de Montreal; Anupriya, Marianne, Hsiao-Wei, Chris, Natan, Nishal, Nick, Leonie, Sue y Jean. También a Javi, fue un placer conocerte ¡Me llevo un montón de amigos!

Gracias a investigadores que han colaborado con nosotros y que han estado dispuestos a discutir muchos de los resultados de esta Tesis Doctoral; Josep Quer, Josep Gregori, Pablo Gastaminza y Antonio Mas.

Gracias a los excelentes servicios del CBM, y sobre todo a la gente que trabaja en ellos y que siempre me ha ayudado; en especial a Alfonso, Irene y Mercedes Dávila.

Gracias a cada uno de los compañeros que me han acompañado durante estos años en el I21, a los que permanecen y a los que ya no están. En especial gracias a Ana e Isabel por su buena disposición y ayuda técnica; a Julie porque siempre que lo he necesitado ha estado ahí para echarme una mano y aconsejarme; a Nacho y Nathan por ser tan majos y aportar siempre ideas interesantes; a Héctor Tejero, por su valiosa ayuda estadística y muy especialmente a Elena, por todas las charlas, tés, comidas, salidas... por estar siempre en los buenos y en los malos momentos, eres una pedazo de amiga y eso no se olvida. No quiero dejar de nombrar a personas que aunque ya no están han sido importantes para mí durante esta etapa; Merle, Erick, Claudia, Alejandro y Guillermo.

Gracias a mis compañeros y también amigos del CBM. Al laboratorio I05 (¡Sois muy grandes!) y especialmente a Flavia, Marga, Moniiii, Ángela, Miguel A, Miguel R y Mónica. A Gloria y Alfonso, os quiero un montón. A “mis queridas siamesas” Pepa y Patri, tantas horas en cultivos han dado para mucho. No puedo olvidarme de mi Bruni (¡cuantas series nos quedan por comentar!) que desde que te conocí te he tenido un cariño especial. Y a otros muchos; Susana, Rober, Sandra, Natalia, Rosa...

A mis profes y compañeros de la Universidad de Málaga, porque ahí comenzó a forjarse lo que soy ahora. Gracias por haber sabido motivarme y haber sido una fuente de inspiración en mis inicios, en especial quiero nombrar a los Dres. Enrique Viguera, Miguel Ángel Medina, Eduardo R Bejarano, Paul Palmqvist y Fernando Pliego. Gracias a mis compañeros Laura, David, Jorge, Jose Rufián y Carlos Rial, entre muchos otros.

A mi familia madrileña, los mejores amigos que se pueden tener. Cuanto habéis tenido que soportarme y que importantes sois para mí. Nunca se me olvidarán el año de Máster, los muchos viajes, cañas, cenas y más cenas (que nos gustan las fajitas...), amigos invisibles, cumpleaños, charlas interminables sobre la Ciencia y la Tesis (¡lo siento ¡aní!). Nunca dejéis de confiar en vosotros por muy duras que a veces se pongan las cosas. Os deseo lo mejor de todo corazón. Martina (mi gema), que suerte tengo de tener una amiga como tú, nunca dejará de sorprenderme lo lista que eres; Vero, por entenderme tan bien y hacerme reír tanto con

tus despistes; Ianire, por tantos momentos inolvidables (y por ser la única persona con la que me he caído por un terraplén); JAR (Jarchu, Jartomate, Buen Niño... y una infinidad de nombres), gracias por ser mi amigo y por preocuparte tanto de mí, cuando vuelvas a México te llevarás un trozo de mi corazón y lo sabes; Laura y Jiji, quién nos iba a decir que llegaría este momento cuando nos juntábamos en el Hayedo durante tus prácticas del CNB... ¡Viva Málaga!

Gracias a toda mi familia por estar siempre ahí y por ser una piña. A mis tías (Mari, Nani y Toñi), a mis tíos (Antonio<sup>3</sup>), a mis primos (Marta, Celia, Lucía y Antonio), a mis suegrs (Isa y Jose), a Dani (por permitir que te robe a Pauli) y sobre todo a mis abuelos Pepa y Antonio, por ser los mejores abuelos del mundo y quererme tanto (yo no ganaría competiciones de pelar gambas si no fuera por vosotros). Gracias por vuestro apoyo incondicional.

A mi hermana Paula, porque siempre sabe sacarme una sonrisa y me entiende cuando estoy insoportable. Porque lo deja todo cuando voy a casa para poder hacer planes juntas. Por ser mi confidente y mi mejor amiga. Te deseo lo mejor y que consigas todo aquello que te propongas. Ah, y gracias por ayudarme con las tablas de deleciones ¡Te quiero, “mana”!

Gracias a mi madre, siempre me has apoyado y has estado ahí, gracias a ti soy la persona que soy ahora. Gracias por la educación que me has dado, por tantos buenos consejos, por tu cariño, por ser mi ejemplo a seguir, por las peleas, por tu fuerza, por tu sacrificio y por ser mi otra mejor amiga. Nunca podré devolverte todo lo que me has dado aunque yo pienso intentarlo. Media Tesis es tuya.

Y la otra media Tesis no podría ser para otra persona que para mi Jose. Me has acompañado en los mejores y peores momentos de mi vida, y siempre has estado a la altura. Gracias por ser mi mejor amigo, mi compañero y mi pilar ¡Gracias por hacerme feliz! Siempre has creído en mi, incluso cuando yo no lo hacía. Eres la persona más fuerte, buena e inteligente que conozco, no sabes lo afortunada que me siento de tenerte a mi lado. ¡Juntos a muerte y a comernos el mundo!

Y finalmente gracias a cada una de las personas que me han apoyado personal o científicamente a lo largo de estos años. Siento no poder nombraros a todos ¡GRACIAS!







## Abreviaturas.

A	adenina.
Ade	adenosina.
ADP	adenosina-5'-difosfato.
AK	adenosina kinasa.
AMP	adenosina-5'-monofosfato.
ATP	adenosina-5'-trifosfato.
C	citosa.
Cap	7-metilguanosina en el extremo 5' del RNAm.
cDNA	DNA copia.
CDP	citidina-5'-difosfato.
cGMP	guanosina-5'-monofosfato cíclico.
Cit	citidina.
CKI	caseína-kinasa I.
CLDNI	claudina-I.
CMP	citidina-5'-monofosfato.
C-terminal	carboxi-terminal.
CTP	citidina-5'-trifosfato.
DEAE	dietilaminoetil.
DMSO	dimetil sulfóxido.
dNTP	2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato.
DTT	ditiotreitól.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EDTA	etilén diamino tetraacetato.
Exo 3'-5'	actividad exonucleasa 3'-5'.
G	guanina.
GAG	glicosaminoglicanos.
GDP	guanosina-5'-difosfato.
GMP	guanosina-5'-monofosfato.
GTP	guanosina-5'-trifosfato.

Gua	guanosina.
IFN	interferón.
IL	interleuquina.
IMP	inosín-5'-monofosfato.
IMPDH	inosín-monofosfato deshidrogenasa.
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-I-tiogalactopiranosido.
kDa	kilodalton.
<i>lacZ</i>	gen que codifica la $\beta$ -galactosidasa.
LB	Luria-Bertani.
Mg <sup>2+</sup>	iones magnesio.
MTT	<i>metil tiazol</i> tetrazolio.
NDP	ribonucleósido-5'-difosfato.
N-terminal	amino-terminal.
NTP	ribonucleósido-5'-trifosfato.
OCLN	occludina.
PEG	pegilado.
PI4KIII $\alpha$	fosfatidilinositol 4-kinasa.
PPi	pirofosfato.
PV	poliovirus.
R	ribavirina.
RDP	ribavirina-5'-difosfato.
RMP	ribavirina-5'-monofosfato.
RE	retículo endoplásmico.
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucleico mensajero.
RNA <sub>r</sub>	ácido ribonucleico ribosómico.
RNP	ribonucleoproteína.
r.p.m.	revoluciones por minuto.
RT	retrotranscriptasa.
RTP	ribavirina-5'-trifosfato.
RVS	respuesta virológica sostenida.
SFB	suero fetal bovino.

Sn	entropía normalizada de Shannon.
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
T	timidina.
TEMED	N,N,N,N'-tetrametiletilenediamina.
U	uracilo.
Uri	uridina.
UDP	uridina-5'-difosfato.
UMP	uridina-5'-monofosfato.
UTP	uridina-5'-trifosfato.
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -D-galactósido

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado los siguientes términos, acrónimos o abreviaturas de la terminología científica inglesa:

AMPK	( <b>A</b> denosine <b>M</b> onophosphate-activated <b>P</b> rotein <b>K</b> inase). Proteín kinasa activada por AMP.
BHK	( <b>B</b> aby- <b>H</b> amster <b>K</b> idney). Riñón de hamster recién nacido.
BSA	( <b>B</b> ovine <b>S</b> erum <b>A</b> lbumin). Albumina de suero bovino.
CC <sub>50</sub>	( <b>C</b> ytotoxic <b>C</b> oncentration 50). Concentración de droga necesaria para reducir el número de células a la mitad.
Cre	( <b>C</b> is acting <b>r</b> eplication <b>e</b> lement). Elemento de replicación en <i>cis</i> .
DAA	( <b>D</b> irectly-Acting <b>A</b> ntiviral <b>A</b> gents). Antivirales de acción directa.
DMEM	( <b>D</b> ulbecco's <b>M</b> odified <b>E</b> agle's <b>M</b> edium). Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco.
DNA	( <b>D</b> esoxiribonucleic <b>A</b> cid). Ácido desoxirribonucleico.
DsRNA	( <b>D</b> ouble strand <b>R</b> NA). RNA de doble cadena.
Fingers	“dedos”. Subdominio de las RpRd.
Fingertips	“punta de los dedos”. Subdominio de las RpRd.
Fitness	eficacia biológica relativa de un virus respecto a otro.
FMDV	( <b>F</b> oot-and- <b>M</b> outh- <b>D</b> isease <b>V</b> irus). Virus de la Fiebre Aftosa.
GFP	( <b>G</b> reen <b>F</b> luorescent <b>P</b> rotein). Proteína verde fluorescente.
HCV	( <b>H</b> epatitis <b>C</b> <b>V</b> irus). Virus de la Hepatitis C.

HIV	( <b>H</b> uman <b>I</b> mmunodeficiency <b>V</b> irus). Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
Huh	( <b>H</b> uman <b>H</b> epatoma). Hepatoma Humano.
HVR-I	( <b>H</b> ypervariable <b>R</b> egion <b>I</b> ). Región hipervariable I.
IC <sub>50</sub>	( <b>I</b> nhibitory <b>C</b> oncentration <b>50</b> ). Concentración de droga necesaria para producir una inhibición del 50% en la producción de virus.
IRES	( <b>I</b> nternal <b>R</b> ibosome <b>E</b> nter <b>S</b> ite). Sitio interno de entrada de ribosomas.
IRRDR	( <b>I</b> FN/ <b>R</b> BV <b>R</b> esistance- <b>D</b> etermining <b>R</b> egion). Región determinante de la resistencia a interferón y ribavirina.
ISDR	( <b>I</b> nterferon <b>S</b> ensitivity- <b>D</b> etermining <b>R</b> egion). Región determinante de la sensibilidad a interferón.
ISG	( <b>I</b> nterferon- <b>S</b> timulated <b>G</b> ene). Gen estimulado por interferón.
LCMV	( <b>L</b> ymphocytic <b>C</b> hori <b>m</b> eningitis <b>V</b> irus). Virus de la coriomeningitis linfocítica.
LDL	( <b>L</b> ow <b>D</b> ensity <b>L</b> ipoprotein). Lipoproteína de baja densidad.
MAVS	( <b>M</b> itochondrial <b>a</b> ntiviral- <b>s</b> ignaling protein). Adaptador mitocondrial de señalización antiviral.
MPA	( <b>M</b> ycophenolic <b>A</b> cid). Ácido micofenólico.
MOI	( <b>M</b> ultiplicity <b>o</b> f <b>I</b> nfection). Multiplicidad de infección.
NLS	( <b>N</b> uclear <b>L</b> ocalization <b>S</b> ignal). Señal de localización nuclear.
PAGE	( <b>P</b> olyacrylamide <b>G</b> el <b>E</b> lectrophoresis). Electroforesis en geles de poliacrilamida.
Palm	“palma”. Subdominio de las RpRd.
PBS	( <b>P</b> hosphate <b>B</b> uffered <b>S</b> aline). Solución salina tamponada con fosfato.
PCR	( <b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction). Reacción en cadena de la polimerasa.
PFU	( <b>P</b> laque <b>f</b> orming <b>u</b> nit). Unidad formadora de placa.
RdRp	( <b>R</b> NA- <b>d</b> ependent <b>R</b> NA <b>p</b> olymerase). Polimerasa de RNA dependiente de RNA.
RFP	( <b>R</b> ed <b>F</b> luorescent <b>P</b> rotein). Proteína roja fluorescente.
RNA	( <b>R</b> ibonucleic <b>A</b> cid). Ácido ribonucleico.
RT-PCR	( <b>R</b> etrotranscriptase- <b>P</b> CR). Reacción de transcripción inversa seguida de amplificación por PCR.
SARS	( <b>S</b> evere <b>A</b> cute <b>R</b> espiratory <b>S</b> yndrome). Síndrome respiratorio agudo severo.
SDS	( <b>S</b> odium <b>D</b> odecyl <b>S</b> ulfate). Dodecil sulfato sódico.

SOC	( <b>S</b> uper <b>O</b> ptimal <b>B</b> roth). Caldo super óptimo.
SR-BI	Receptor Scavenger clase B tipo I.
Tailing	Reacción de adición de A en el extremo del DNA mediante DNA polimerasa <i>Taq</i> .
TCID <sub>50</sub>	( <b>T</b> issue <b>C</b> ulture <b>I</b> nfectious <b>D</b> ose <b>50</b> ). Es la dosis infecciosa necesaria para infectar el 50% de las células en un cultivo celular.
Th1/2	(T <b>h</b> elper 1/2). Linfocitos T cooperadores 1 ó 2.
Thumb	“pulgar”. Subdominio de las RdRp.
TRIF	( <b>TIR</b> -domain-containing adapter-inducing <b>interferon-β</b> ). Activador de interferón asociado al receptor <i>Toll</i> .
UDPS	( <b>U</b> ltra- <b>d</b> eep <b>P</b> yrosequencing). Secuenciación masiva.
UTR	( <b>U</b> n <b>t</b> ranslated <b>R</b> egion). Región genómica no codificante.
VLDL	( <b>V</b> ery <b>L</b> ow <b>D</b> ensity <b>L</b> ipoprotein). Lipoproteína de muy baja densidad.
VSV	( <b>V</b> esicular <b>S</b> tomatitis <b>V</b> irus). Virus de la estomatitis vesicular.
Western Blot	técnica inmunoenzimática para la detección de proteínas.
wt	( <b>w</b> ild- <b>t</b> ype). Tipo salvaje.

Códigos de una y tres letras de los aminoácidos:

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V





# Índice.

	Página
<b>1. Summary (Resumen).....</b>	<b>25</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>27</b>
2.1. Virus RNA.....	27
2.2. Variabilidad genética en las poblaciones de virus RNA.....	27
2.2.1. Cuasiespecies como concepto de unidad de selección.....	28
2.2.2. Implicaciones biológicas de la dinámica de cuasiespecies.....	30
2.3. Catástrofe de error, defección letal y mutagénesis letal como estrategia antiviral.....	31
2.4. El virus de la hepatitis C (HCV) como modelo de estudio de cuasiespecies virales y mutagénesis letal.....	32
2.4.1. HCV y la familia <i>Flaviviridae</i> .....	32
2.4.2. Sistemas modelo para el estudio del HCV.....	34
2.4.3. Estructura y función de las regiones no codificantes y de las proteínas de HCV.....	35
2.4.3.1. Regiones no codificantes.....	35
2.4.3.2. Estructura y función de las proteínas virales.....	36
2.4.4. Estructura del virión y ciclo de vida.....	39
2.5. Situación actual del tratamiento contra HCV.....	41
2.6. Agentes antivirales frente a HCV.....	42
2.6.1. Ribavirina.....	42
2.6.1.1. Estructura y metabolismo de la ribavirina.....	42
2.6.1.2. Mecanismos antivirales propuestos para la ribavirina en virus RNA...	43
2.6.1.3. Efecto de la ribavirina en HCV.....	45
2.6.1.4. Resistencia a ribavirina en HCV.....	45
2.6.2. Guanosina, un metabolito con acción inhibidora sobre HCV.....	46
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>47</b>
<b>4. Materiales y métodos.....</b>	<b>49</b>
4.1. Cultivos de células eucariotas.....	49
4.1.1. Congelación y almacenamiento de células.....	50
4.1.2. Descongelación de células.....	50
4.2. Virus utilizados.....	51
4.3. Compuestos empleados.....	51
4.4. Concentración citotóxica 50 (CC <sub>50</sub> ).....	51
4.5. Concentración inhibitoria 50 (IC <sub>50</sub> ).....	52
4.6. Infecciones virales.....	52
4.6.1. Producción de progenie viral de HCV.....	52
4.6.2. Pases seriados de HCV.....	52
4.6.3. Titulación de HCV.....	53
4.6.4. Infecciones y titulaciones de VSV, FMDV y LCMV.....	54
4.7. Extracción de RNA viral.....	54
4.8. Preparación de cDNA viral.....	55
4.9. Amplificación del cDNA viral.....	55
4.10. Purificación de fragmentos de DNA amplificados por PCR.....	56
4.11. Secuenciación de DNA.....	56

4.12. Cuantificación de moléculas de RNA viral por amplificación mediante RT-PCR en tiempo real.....	57
4.13. Extinción del HCV.....	57
4.14. Clonaje molecular para el análisis genético de poblaciones de HCV.....	58
4.14.1. Clonaje en pGEM-T/pGEM-T Easy y transformación de bacterias DH5 $\alpha$ ...	58
4.14.2. Clonaje en pBluescript y transformación de bacterias DH10B.....	59
4.14.3 Amplificación del DNA previamente clonado.....	59
4.15. Análisis por secuenciación masiva de poblaciones de HCV.....	60
4.16. Cálculo de frecuencias de mutación mínima y máxima, diversidad nucleotídica y entropía de Shannon normalizada.....	61
4.17. Análisis de niveles de nucleótidos intracelulares.....	62
4.18. Ensayos bioquímicos con la polimerasa NS5B.....	63
4.18.1 Expresión y purificación de la proteína NS5B.....	63
4.18.2 Marcaje en 5' del dinucleótido GG.....	64
4.18.3. Ensayo de elongación.....	64
4.19. Análisis estadísticos.....	65
4.20. Disoluciones y tampones utilizados.....	65
<b>5. Resultados.....</b>	<b>67</b>
5.1. Extinción del virus de la hepatitis C por ribavirina en células de hepatoma humano.....	67
5.1.1. Concentración citotóxica 50 (CC <sub>50</sub> ) de ribavirina para células Huh-7.5 reporter.....	67
5.1.2. Concentración inhibitoria 50 (IC <sub>50</sub> ) de ribavirina para el virus de la hepatitis C.....	68
5.1.3. Influencia de las condiciones experimentales sobre la replicación del virus de la hepatitis C durante el tratamiento con ribavirina.....	68
5.1.4. Complejidad del espectro de mutantes en poblaciones del virus de la hepatitis C en ausencia o presencia de ribavirina.....	71
5.1.5. Efecto de la guanosina sobre la actividad inhibidora y mutagénica de la ribavirina. Alteración de los niveles de nucleótidos intracelulares en células Huh-7.5 reporter.....	79
5.1.6. Efecto del ácido micofenólico sobre la producción de progenie viral y RNA viral intracelular. Alteración de los niveles de nucleótidos intracelulares en células Huh-7.5 reporter.....	83
5.1.7. Efecto de la ribavirina y el ácido micofenólico sobre la infectividad específica y la secuencia consenso del genoma del virus de la hepatitis C.....	86
5.1.8. Ensayos bioquímicos de fidelidad y reconocimiento de ribavirina.....	88
5.2. Acción antiviral de la guanosina sobre el virus de la hepatitis C.....	91
5.2.1. Concentración citotóxica 50 (CC <sub>50</sub> ) de guanosina, adenosina, citidina y uridina para células Huh-7.5 reporter.....	91
5.2.2. Concentración inhibitoria 50 (IC <sub>50</sub> ) de guanosina, adenosina, citidina y uridina para el virus de la hepatitis C.....	91
5.2.3. Efecto de la guanosina sobre el virus de la hepatitis C y sobre el nivel intracelular de nucleótidos.....	94
5.2.4. Efecto de otros nucleósidos sobre el virus de la hepatitis C y sobre el nivel intracelular de nucleótidos.....	97
5.2.5. Complejidad del espectro de mutantes en poblaciones del virus de la hepatitis C pasadas en ausencia o presencia de guanosina.....	99
5.2.6. Efecto de la guanosina sobre la infectividad específica y la secuencia consenso del genoma del virus de la hepatitis C.....	106
5.2.7. Efecto de la guanosina sobre una población del virus de la hepatitis C de alto <i>fitness</i> .....	107
5.2.8. Efecto de la guanosina sobre otros virus RNA.....	107

5.2.8.1. Concentración citotóxica 50 (CC <sub>50</sub> ) de los nucleósidos guanosina, adenosina, citidina y uridina para células BHK-21 .....	108
5.2.8.2. Concentración inhibitoria 50 (IC <sub>50</sub> ) de guanosina, adenosina, citidina y uridina sobre otros virus RNA.....	108
5.2.8.3. Efecto de guanosina, adenosina, citidina y uridina sobre distintos virus RNA a lo largo de pases seriados.....	112
5.2.8.4. Efecto de la guanosina sobre VSV en células Huh-7.5 reporter.....	112
5.2.9. Efecto de la ribavirina y la guanosina sobre el virus de la hepatitis C y sobre el nivel de nucleótidos intracelulares en células Huh-7.5 reporter.....	115
5.2.10. Efecto del ácido micofenólico y la guanosina sobre el virus de la hepatitis C y sobre el nivel de nucleótidos intracelulares en células Huh-7.5 reporter.....	118
<b>6. Discusión.....</b>	<b>121</b>
6.1 Extinción del virus de la hepatitis C mediada por ribavirina.....	121
6.2 La guanosina como mediadora de una actividad antiviral contra el virus de la hepatitis C.....	126
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>131</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>133</b>
<b>9. Anexos.....</b>	<b>157</b>
<b>10. Artículo publicado.....</b>	<b>169</b>



## I. Summary (Resumen).

RNA viruses exhibit high mutation rates during genome replication. Nucleotide analogues can increase the mutation rate of RNA viruses by acting as ambiguous substrates during replication. They have been explored as antiviral agents acting through lethal mutagenesis. Lethal mutagenesis, or virus extinction produced by enhanced mutation rates, is an antiviral strategy that aims at counteracting the adaptive capacity of viral quasispecies, avoiding selection of antiviral-escape mutants. Hepatitis C virus (HCV) is a RNA virus whose infections affect about 180 million people worldwide, and about 75% of newly infected patients progress towards a chronic infection, with a risk of severe liver disease. The main objective of this PhD thesis was to characterize the mechanism of anti-HCV activity produced by ribavirin in hepatoma Huh-7.5 in cell culture. The study led to the observation that guanosine can produce inhibition of HCV progeny production, and that inhibition is also related to a lethal mutagenic effect triggered by this nucleoside.

Ribavirin is a recognised mutagenic agent for several other RNA viruses, but it is not clear whether it exerts its anti-HCV activity through mutagenesis or other mechanisms. In the present thesis we provide evidence of a mutagenic activity of ribavirin, documented by statistically significant increases of mutant spectrum complexity (as determined by mutation frequency, genetic distances and Shannon entropy), and a mutational bias in favor of G→A and C→U transitions. Both molecular cloning and Sanger sequencing, and ultra-deep pyrosequencing have been used for the analysis of HCV populations. Ribavirin treatment resulted in nucleotide imbalances (a reduction of intracellular GTP and an increase of UTP, ATP and CTP). Control experiments using mycophenolic acid and guanosine indicated that GTP depletion cannot explain ribavirin mutagenesis. Moreover, HCV extinction by ribavirin, but not by the non-mutagenic HCV inhibitor mycophenolic acid, occurred with decreases of specific infectivity, a feature typical of lethal mutagenesis. Thus, at least part of the antiviral activity of ribavirin on HCV in Huh-7.5 cells is exerted via lethal mutagenesis.

Unexpectedly, guanosine which partially counteracted the inhibitory activity of ribavirin, inhibited HCV progeny production. We studied the effect of high concentrations of guanosine and other nucleotides on HCV and Huh-7.5 cells. Guanosine, but not the other nucleosides, produces a general decrease of the NTP/NDP ratios. Guanosine exerts its anti-HCV activity through mutagenesis, with a significant increase of the proportion of deletions and insertions, accompanied of a decrease of specific infectivity. This antiviral activity is not observed with other RNA viruses, and it constitutes the first example of a metabolite-induced lethal mutagenesis.

The results open the way to study means to increase the efficacy of lethal mutagenesis-based treatments for HCV infections.



## **2. Introducción.**

### **2.1. Virus RNA.**

Los virus son agentes infecciosos microscópicos y acelulares sin metabolismo propio; es por ello que necesitan un hospedador para replicar. El ciclo infeccioso de un virus está constituido por varias etapas: reconocimiento de células susceptibles, entrada, desensamblaje de las partículas, uso del metabolismo celular para replicarse y producir progenie viral infecciosa y salida de la célula (Ehrenfeld et al, 2010). Las infecciones víricas pueden ser citopáticas o persistentes; ello depende de la naturaleza del virus, de la célula infectada y del hospedador (Buenz & Howe, 2006; Domingo et al, 1998; Kirzinger & Stavrinides, 2012; Oldstone, 2006).

Los virus RNA son virus que usan RNA como material genético. El RNA puede ser monocatenario o bicatenario. Los virus con RNA monocatenario pueden clasificarse, a su vez, según la polaridad de su RNA genómico en negativos (RNA de polaridad opuesta a la de los RNA mensajeros víricos) o positivos (RNA de la misma polaridad que los RNA mensajeros víricos). Estos virus suponen el 70% de los virus patógenos que infectan organismos superiores y producen enfermedades de importancia biomédica (SIDA, hepatitis víricas, poliomielitis, gripe, etc.) y agroalimentaria (fiebre aftosa, lengua azul, virus de la tristeza de los cítricos, etc.)

### **2.2. Variabilidad genética en las poblaciones de virus RNA.**

Las poblaciones de virus RNA exhiben una elevada variabilidad y heterogeneidad genética lo que les confiere una gran capacidad adaptativa (Domingo et al, 2012). Los virus RNA de mamíferos que evolucionan más rápidamente son aquellos que infectan células epiteliales. Se ha visto que el tropismo celular es capaz de predecir las frecuencias de mutación a largo plazo de virus RNA y su capacidad adaptativa (Hicks & Duffy, 2014). La gran variabilidad genética típica de las poblaciones de virus RNA se debe a varios factores que se explican a continuación.

El primero de ellos es la elevada tasa de error durante la replicación del RNA viral. Las frecuencias de mutación observadas para virus RNA se encuentran en torno a  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  errores por nucleótido copiado (Batschelet et al, 1976; Domingo & Gomez, 2007; Drake, 1991; Drake & Holland, 1999). Estos valores son muy superiores a los que presentan los organismos con DNA como material genético (de  $10^{-8}$  a  $10^{-11}$  errores por nucleótido copiado) (Drake,

1991; Echols & Goodman, 1991; Kunkel & Alexander, 1986). Contrariamente a las RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp), las DNA polimerasas celulares replicativas incluyen actividades exoribonucleasa 3'-5' (*Exo 3'-5'*) correctoras de errores (Bernad et al, 1989). Los virus RNA carecen de actividad correctora de errores a excepción del género *Coronavirus*, al que pertenece el virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), y que cuenta con una actividad *Exo 3'-5'* en su proteína Nsp14 (Denison et al, 2011; Eckerle et al, 2010; Eckerle et al, 2007). Los *Coronavirus* a los que se les ha inactivado la actividad *Exo 3'-5'* son susceptibles a la mutagénesis letal usando los análogos de nucleósido ribavirina (R) y 5'-Fluorouracilo (FU) (Smith et al, 2013). Otra causa por la cual los nucleótidos incorporados erróneamente en los virus RNA no pueden ser reparados, lo que incrementa la tasa de error, es la ausencia de mecanismos de reparación de DNA celulares. Los mecanismos de reparación de error que ejercen su actividad en una fase post-replicativa actúan sobre DNA bicatenario, pero no sobre RNA bicatenario o híbridos de DNA:RNA (Friedberg et al, 2006; Schaaper, 1993).

Los virus RNA cuentan con ciclos replicativos rápidos ya que son capaces de producir generalmente una numerosa progenie infecciosa en cuestión de minutos u horas de infección, lo que representa múltiples rondas de replicación de RNA vírico durante las cuales se introduce un alto número de mutaciones en el RNA.

Otros dos mecanismos que añaden variabilidad a las poblaciones de virus son la capacidad de recombinar de manera homóloga y no homóloga, más frecuente en virus de polaridad positiva (Agol, 2006; Gallei et al, 2004; Gonzalez-Candelas et al, 2011; Mikkelsen & Pedersen, 2000). En virus RNA segmentados los reordenamientos génicos generan grandes cambios genotípicos y fenotípicos. Los reordenamientos génicos en el virus de la gripe son a menudo el origen de saltos antigénicos (cambios grandes que afectan a uno o ambos antígenos de superficie) y pandemias (Greenbaum et al, 2012; Smith et al, 2009).

### **2.2.1. Cuasiespecies como concepto de unidad de selección.**

La teoría de cuasiespecies fue desarrollada por Eigen y Schuster como un modelo de evolución molecular para describir la estructura poblacional y adaptabilidad de replicones primitivos (Biebricher & Eigen, 2006; Domingo et al, 2012; Eigen, 1971; Eigen & Biebricher, 1988; Eigen et al, 1988; Eigen & Schuster, 1979). Los primeros modelos experimentales utilizados fueron el fago Q $\beta$ , el virus de la fiebre aftosa (FMDV) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Domingo et al, 1980; Domingo et al, 1978; Holland et al, 1982; Sobrino et al, 1983). El concepto de cuasiespecies se refiere mayoritariamente a virus RNA, pero también aplica a la organización de algunos virus DNA (Ge et al, 2007; Isnard et al, 1998; López-Bueno

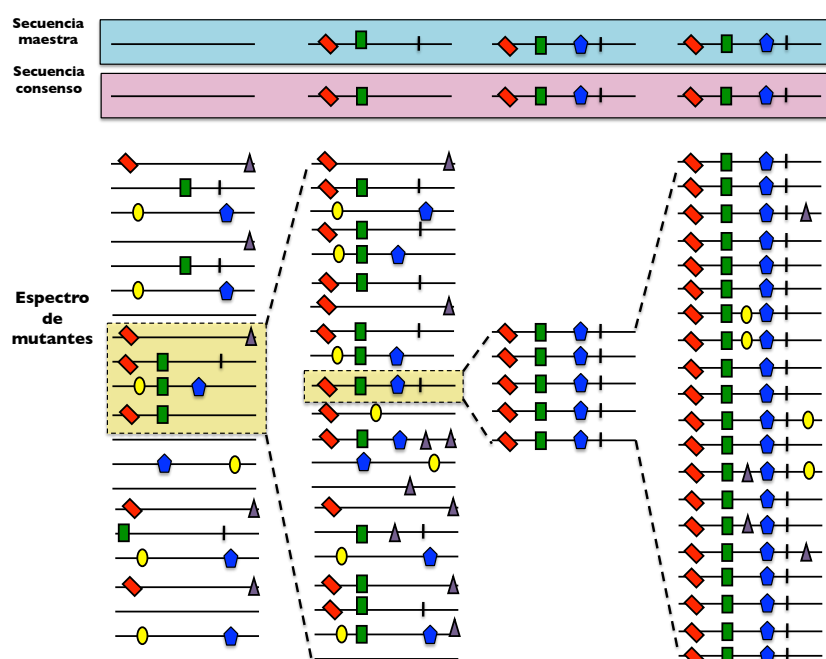


et al, 2006). Más recientemente el término cuasiespecies se ha utilizado para explicar la heterogeneidad genética de bacterias y células tumorales así como la heterogeneidad conformacional de priones (Li et al, 2011; Ojosnegros et al, 2011; Solé & Deisboeck, 2004; Weissmann et al, 2011).

Las cuasiespecies víricas se definen como un conjunto de genomas no idénticos, pero estrechamente relacionados entre sí, llamados también espectro de mutantes que están sometidos a variación genética, competición y selección. Las cuasiespecies se caracterizan por poseer una secuencia *consenso* y una secuencia *maestra* (Fig. 2.2). *Consenso* es la secuencia nucleotídica que presenta en cada posición el nucleótido más frecuente en el conjunto de genomas de la población y no tiene por qué estar representada en el espectro de mutantes. *Maestra* es la secuencia dominante en la población por tener la mayor capacidad replicativa (*fitness* o eficacia biológica) (Biebricher & Eigen, 2006).

Además de los factores genéticos señalados al comienzo del apartado, en los virus RNA también está favorecida la generación de diversidad por el elevado tamaño poblacional, la presencia ocasional de cuellos de botella poblacionales o los cambios ambientales, entre otros factores. En las poblaciones de virus gran cantidad de genomas mutantes no son viables o poseen una eficacia biológica inferior a la del virus silvestre (revisado en Domingo et al, 2012). En esta situación, entre aparición y desaparición de genomas, la población puede aproximarse a un equilibrio en el que coexisten múltiples genomas que constituyen el espectro de mutantes (Manrubia et al, 2005). Esta estructura poblacional de las cuasiespecies víricas ha sido el punto central de las investigaciones en nuestro laboratorio (Domingo & Gomez, 2007; Domingo et al, 2006; Domingo et al, 1978; Eigen, 1993; Holland et al, 1982; Manrubia et al, 2005; Nowak, 1992).

Los cuellos de botella poblacionales consisten en una reducción drástica del tamaño poblacional, que produce la amplificación de subpoblaciones de genomas, lo que dará lugar a una nueva cuasiespecie que puede diferir de la parental en la composición de genomas y, en consecuencia, en las propiedades biológicas del conjunto (Escarmís et al, 1996; Pfeiffer & Kirkegaard, 2006) (Fig. 2.2).



**Figura 2.2. Esquema de la estructura de cuasiespecies y sus mecanismos de evolución.** En la parte superior se representan las secuencias maestra y consenso de cada cuasiespecie. Las líneas representan genomas y los símbolos sobre cada línea indican mutaciones. En las columnas se representan cuatro cuasiespecies formadas por genomas relacionados pero no idénticos. La selección de un número elevado de genomas (recuadro amarillo izquierdo) produce una cuasiespecie cuyas secuencias maestra y consenso son diferentes entre sí y

varían respecto a la población original. Un cuello de botella (cuadro amarillo derecho) generalmente dará lugar a una cuasiespecie más homogénea (secuencias consenso y maestra parecidas o idénticas).

### 2.2.2. Implicaciones biológicas de la dinámica de cuasiespecies.

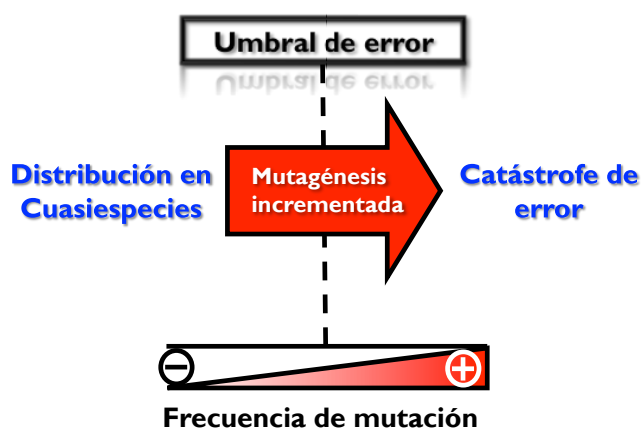
Las propiedades de una cuasiespecie dependen de los genomas que la forman y de como interaccionan positiva (complementación) o negativamente (interferencia) los unos con los otros. La gran variedad genotípica y fenotípica de los genomas que la componen dotan a la cuasiespecie de una alta capacidad de adaptación a distintos ambientes y circunstancias adversas. El ambiente que se genera por acción del sistema inmune de un organismo infectado supone un reto adaptativo para un virus. Para resistir a la respuesta inmune un virus puede utilizar dos estrategias distintas: la modulación o la evasión (Alcami, 2003; Borrego et al, 1993; Carman et al, 1993; Seet et al, 2003; Webster, 1999). La existencia de multitud de genomas distintos hacen posible ampliar el rango de hospedador, el tropismo celular y variar el grado de virulencia (Baranowski et al, 2003; Bergelson, 2003; Borderia et al, 2010; Domingo et al, 2012; Spear et al, 2000). El tratamiento de enfermedades de origen vírico se hace difícil por la generación o selección de mutantes resistentes a los agentes antivirales en la población (Domingo et al, 2012) .

La complejidad del espectro de mutantes también influye en el comportamiento y la adaptación de una población de virus. En poliovirus (PV) se ha observado que un virus mutante con fidelidad de copia incrementada genera una cuasiespecie más homogénea que el virus silvestre, lo que elimina su capacidad de infectar el sistema nervioso central en ratones (Pfeiffer

& Kirkegaard, 2005a; Vignuzzi et al, 2006). Por otra parte, una mayor complejidad de la cuasiespecie del virus de la hepatitis C (HCV) en pacientes crónicamente infectados se corresponde con una menor probabilidad de eliminación del virus mediante el tratamiento estándar de interferón- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) y R (Farci et al, 2000; Pawlotsky, 2000; Pawlotsky et al, 1998), aunque otros estudios no han permitido generalizar dicha afirmación (Donlin et al, 2007; Fan et al, 2009).

### **2.3. Catástrofe de error, defección letal y mutagénesis letal como estrategia antiviral.**

Estudios teóricos sobre replicación de genomas con altas tasas de error predijeron la existencia de un umbral de error en la copia de material genético por encima del cual no es posible mantener la información genética de modo estable (Eigen, 2002; Eigen & Biebricher, 1988; Schuster & Stadler, 1999; Swetina & Schuster, 1982). Al proceso de superar ese umbral de error se le conoce como entrada en catástrofe de error. La transición a catástrofe de error en virus está marcada por la pérdida de superioridad de la secuencia maestra y por una alteración del espacio de secuencias. Como extensión del concepto de catástrofe de error al caso de virus, se denomina mutagénesis letal al proceso de extinción de virus por aumento de la tasa de error (Anderson et al, 2004; Domingo, 2005; Loeb et al, 1999; Loeb & Mullins, 2000). Las poblaciones virales que replican con una fidelidad de copia por encima del umbral de error muestran acumulación de mutaciones deletéreas, de manera que los genomas pasan a estar sometidos a una selección negativa sin posibilidad de escape, lo que conduce a la pérdida de la información genética y a la extinción (Fig. 2.3). Un incremento en la tasa de mutación puede generar genomas virales defectivos, pero competentes en replicación, denominados defectores. Los genomas defectores interfieren con la replicación del virus estándar y contribuyen a la supresión de la replicación del conjunto de la población y al colapso del sistema. Este modelo denominado modelo de defección letal fue descrito para LCMV (Grande-Pérez et al, 2005b). La interferencia ejercida por genomas defectivos con sustituciones de aminoácido bien caracterizadas en la cápsida y polimerasa víricas fue demostrada con el FMDV (Perales et al, 2007). Es conveniente distinguir la defección letal de la extinción debida a un incremento de mutaciones letales. El modelo actual más aceptado es que la defección letal constituye una fase inicial de mutagénesis letal que puede solaparse con la siguiente fase de aparición de mutaciones letales. Tanto la defección letal como las mutaciones letales pueden llevar el virus a la extinción (Domingo et al, 2012). Las características de la mutagénesis letal son incremento de la frecuencia de mutación, invariabilidad de la secuencia nucleotídica consenso y en algunos casos un desplazamiento en el espacio de secuencias con aparición temprana de genomas hipermutados (Domingo et al, 2012).



**Figura 2.3. Esquema de la entrada en catástrofe de error en virus.** La tasa de mutación durante la replicación de los virus está determinada por la necesidad de la transmisión fiable de la información genética (Eigen, 2002). Cuando la fidelidad de copia disminuye hasta alcanzar el umbral de error, la cuasiespecie no tiene capacidad de adaptación por acumulación excesiva de mutaciones deletéreas y el sistema entra en catástrofe de error.

La mutagénesis letal ha sido demostrada para distintos virus, en estudios en cultivos celulares e *in vivo*, empleando agentes mutagénicos, notablemente análogos de nucleósido. Algunos ejemplos son el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) (Dapp et al, 2013; Loeb et al, 1999; Tapia et al, 2005), PV (Crotty et al, 2002; Crotty et al, 2001; Crotty et al, 2003; Crotty et al, 2000), FMDV (Airaksinen et al, 2003; González-López et al, 2004; Pariente et al, 2003; Pariente et al, 2005; Sierra et al, 2000), virus de la coriomeningitis linfocítica de ratón (LCMV) (Grande-Pérez et al, 2005a; Grande-Pérez et al, 2005b; Grande-Pérez et al, 2002), entre otros. Para el HCV se ha demostrado que la ribavirina es mutagénica, pero la primera evidencia de que se extingue por mutagénesis letal se ha obtenido en la presente Tesis Doctoral (Asahina et al, 2005; Contreras et al, 2002; Dietz et al, 2013; Hofmann et al, 2007; Kanda et al, 2004; Ortega-Prieto et al, 2013; Pfeiffer & Kirkegaard, 2005b; Zhou et al, 2003).

## **2.4. El virus de la hepatitis C (HCV) como modelo de estudio de cuasiespecies virales y mutagénesis letal.**

### **2.4.1. HCV y la familia *Flaviviridae*.**

El HCV fue identificado en 1989 a partir de suero de un paciente que presentaba hepatitis no-A, no-B (Choo et al, 1989). HCV afecta principalmente al hombre, aunque el chimpancé también puede ser infectado y ha servido como animal modelo en investigaciones *in vivo*. Virus relacionados con el HCV humano han sido aislados recientemente en otras especies animales (Kapoor et al, 2011; Kapoor et al, 2013). El virus infecta principalmente hepatocitos, aunque también se ha descrito infección de otros tipos celulares como los linfocitos B y T, las células dendríticas y los monocitos (Kondo & Shimosegawa, 2013).

Aproximadamente 170 millones de personas en el mundo (un 3% de la población mundial) están infectadas con el HCV (según datos de la Organización Mundial de la Salud,

OMS). Al ser un virus hepatotrópico los individuos crónicamente infectados tienen un alto riesgo de desarrollar enfermedades severas en el hígado, incluyendo cirrosis y carcinoma hepatocelular (Deuffic-Burban et al, 2007; Ploss & Dubuisson, 2012; Quer et al, 2008; Williams, 2006). El virus se transmite principalmente a través de la exposición percutánea directa con sangre infectada, típicamente por transfusión sanguínea o por uso compartido de jeringuillas. También hay riesgo de transferencia vertical en el caso de mujeres con altos niveles de carga viral durante el embarazo.

HCV pertenece al género *Hepacivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*. El virus se caracteriza por ser pleiomórfico, con envuelta, tener un diámetro aproximado de 50-80 nm y una nucleocápsida de simetría icosaédrica. Su genoma es un RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de 9,6 Kb. Está compuesto de una región 5' no codificante (que incluye un sitio de entrada del ribosoma, IRES), un marco de lectura abierto que codifica las proteínas estructurales y no estructurales, y una región 3' no codificante (Hoffman & Liu, 2011). Las proteínas estructurales (que forman la partícula viral) incluyen la proteína core y las glicoproteínas E1 y E2 de la envuelta. Las proteínas no estructurales son la p7 (canal iónico), la proteasa NS2-3, la serín-proteasa NS3 (que también posee actividad helicasa de RNA), la NS4A o cofactor de la NS3, la proteína transmembrana NS4B, la fosfoproteína NS5A y la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) NS5B (Moradpour et al, 2007; Scheel & Rice, 2013). La variabilidad genética de este virus se debe principalmente a su alta tasa replicativa (se estima que la producción y eliminación de partículas virales es aproximadamente  $10^{12}$  partículas virales por persona y día), a una alta tasa de error debida a la falta de una actividad correctora de pruebas en su RdRp y a la ausencia de actividades de corrección de errores post-replicativos en el RNA (Domingo et al, 2012; Neumann et al, 1998). Así, su comportamiento a nivel poblacional se rige por la dinámica de cuasiespecies (Farci, 2011; Martell et al, 1992; Pawlotsky, 2006).

Los aislados de HCV se clasifican en genotipos y subtipos. Se han descrito 7 genotipos, que difieren en su secuencia nucleotídica en un 31-34%. Dentro de cada genotipo, los subtipos se distinguen a su vez por variaciones de secuencia en torno al 20-25% (Simmonds et al, 2005). Los subtipos más representados en los países occidentales son 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a y 6a. Esta Tesis Doctoral se ha centrado en estudiar el efecto de drogas antivirales sobre un virus del subtipo 2a adaptado a cultivos de células hepáticas.

#### **2.4.2.Sistemas modelo para el estudio del HCV.**

El establecimiento de sistemas modelo (animales y cultivos celulares) que permitan estudiar los distintos aspectos de la patogenia de HCV constituye un enorme desafío en el campo de la virología humana. Hasta el momento el único modelo animal capaz de mimetizar la infección en humanos es el chimpancé, que ha sido crucial para realizar estudios de inmunidad innata y adaptativa, así como de eficacia de vacunas experimentales frente a HCV (Bukh, 2012). Otros modelos animales como el ratón no son susceptibles de forma natural a la infección. Sin embargo, la infección de ratones inmunocompetentes modificados genéticamente que expresan de manera transitoria dos factores humanos esenciales, la tetraspanina (CD81) y la ocludina (OCLN), han permitido validar el papel de ambas proteínas en la entrada del virus (Dorner et al, 2011). En ratones transgénicos que expresan de manera estable los receptores CD81 y OCLN se han obtenido evidencias de producción de partículas virales *de novo* (Dorner et al, 2013). Además, el desarrollo de ratones con hígado humanizado también ha permitido crear líneas permisivas a la infección (Mercer et al, 2001). Un modelo animal pequeño que reproduzca todas las etapas de la infección sería una herramienta enormemente prometedora para investigaciones futuras sobre patogenia viral *in vivo*, ensayo de vacunas y nuevas aproximaciones terapéuticas.

El establecimiento en el año 1999 de un sistema de replicación para el genotipo 1b basado en replicones subgenómicos conteniendo las zonas codificantes de proteínas no estructurales constituyó un punto de partida importante para entender la replicación intracelular de HCV en células de hepatoma humano (Lohmann et al, 1999). La presencia de mutaciones de adaptación fue necesaria para aumentar la eficiencia de estos replicones (Blight et al, 2000). En 2003, el desarrollo de un sistema de pseudopartículas donde las glicoproteínas E1 y E2 de HCV se ensamblaron en partículas lentivirales permitió profundizar en el estudio de la entrada viral así como de anticuerpos neutralizantes (Bartosch et al, 2003; Hsu et al, 2003). En 2005, las características replicativas únicas del aislado JFH-1 del genotipo 2a permitieron completar el ciclo viral en células de hepatoma humano sin la necesidad de mutaciones de adaptación. Tanto este aislado como virus quiméricos derivados de él, constituyeron el primer sistema robusto de producción de partículas virales en cultivos celulares (Lindenbach et al, 2005; Wakita et al, 2005; Zhong et al, 2005). Este aislado permitió establecer quimeras de distintos genotipos en las regiones core-NS2, NS3-4A y NS5A (Gottwein et al, 2009; Pietschmann et al, 2006; Scheel et al, 2011). Recientemente se han establecido nuevos sistemas de replicación en cultivos celulares para aislados de HCV de los genotipos 1a, 2a, 2b y 3a (Kim et al, 2014; Li et al, 2012a; Li et al, 2012b). Ninguno de ellos muestra una eficacia replicativa comparable a la del aislado JFH-1. La mejora de la replicación de HCV quiméricos sería

esencial para caracterizar con mayor detalle el ciclo de vida de HCV, así como para profundizar en la eficacia de drogas antivirales dirigidas tanto a dianas virales como celulares.

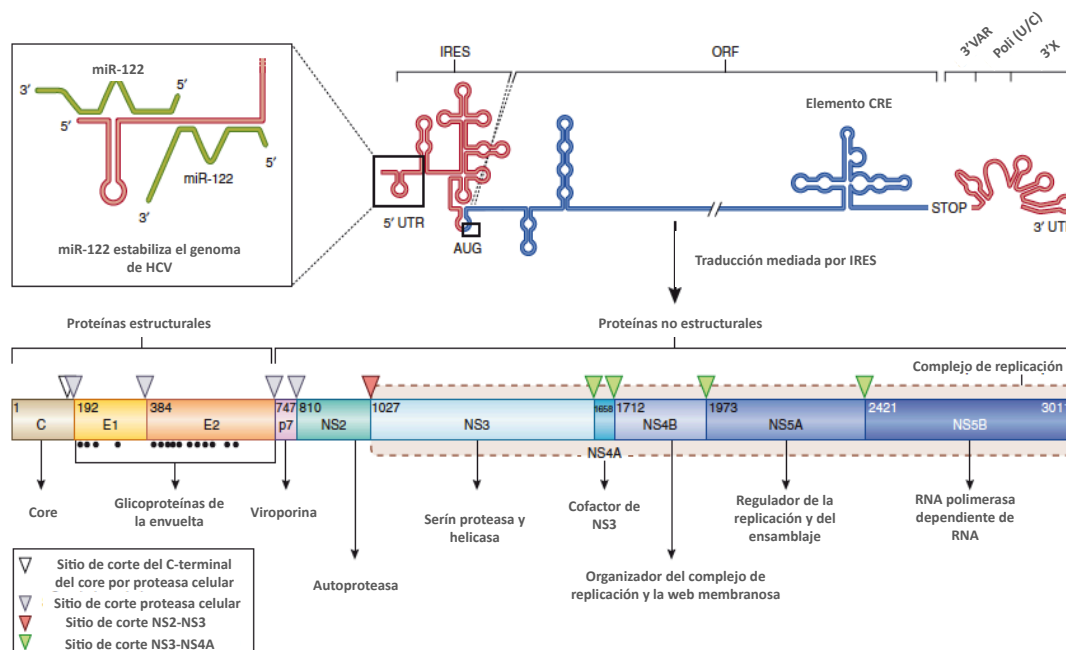
Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a una colaboración con el grupo del Dr. Charles Rice de quien hemos obtenido el plásmido conteniendo el genoma completo de HCV adaptado a replicar en cultivos de células de hepatoma humano (Lindenbach et al, 2005) (ver apartado 4.2 de Materiales y Métodos).

### 2.4.3. Estructura y función de las regiones no codificantes y de las proteínas de HCV.

#### 2.4.3.1. Regiones no codificantes.

##### 5' UTR .

Es la región no codificante situada en el extremo 5' del RNA. Está altamente conservada entre aislados y contiene un IRES (importante para la traducción independiente de cap) y 4 dominios (I a IV) de los cuales los dominios I y II son imprescindibles para la replicación del genoma viral (Friebe et al, 2001). El microRNA miR-122, que se expresa de forma abundante y específica en el hígado, potencia la replicación uniéndose al extremo 5'UTR. El RNA miR-122 ha sido considerado una posible diana terapéutica (Jopling et al, 2005) (Fig. 2.4.3.1).



**Figura 2.4.3.1. Esquema del genoma de HCV y del procesamiento de la poliproteína.** Las distintas regiones y su función se describen en el texto. Véase que hay una interrupción en la cadena de RNA donde mapea la ORF. Adaptado de (Scheel & Rice, 2013).

### 3' UTR .

Es la región no codificante situada en el extremo 3' y está compuesta por una región variable corta, un poli U/UC de unos 80 nucleótidos y otra conservada de 98 nucleótidos llamada X-tail (3'X) (Fig. 2.4.3.1). Ésta última y parte de la región variable son esenciales para la replicación tanto *in vivo* como *in vitro* (Friebe & Bartenschlager, 2002; Kolykhalov et al, 2000; Yanagi et al, 1999; Yi & Lemon, 2003).

### CRE .

Es un elemento que actúa *in cis* y es esencial para la replicación. Se sitúa en la región C-terminal de la NS5B (Fig. 2.4.3.1). El stem loop 5B-SL3.2 (que se encuentra dentro de una estructura cruciforme llamada 5B-SL3) es esencial e interacciona con el X-tail de la región 3' UTR creando un pseudonudo necesario para la replicación (Friebe et al, 2005; You et al, 2004).

### **2.4.3.2. Estructura y función de las proteínas virales.**

#### Core.

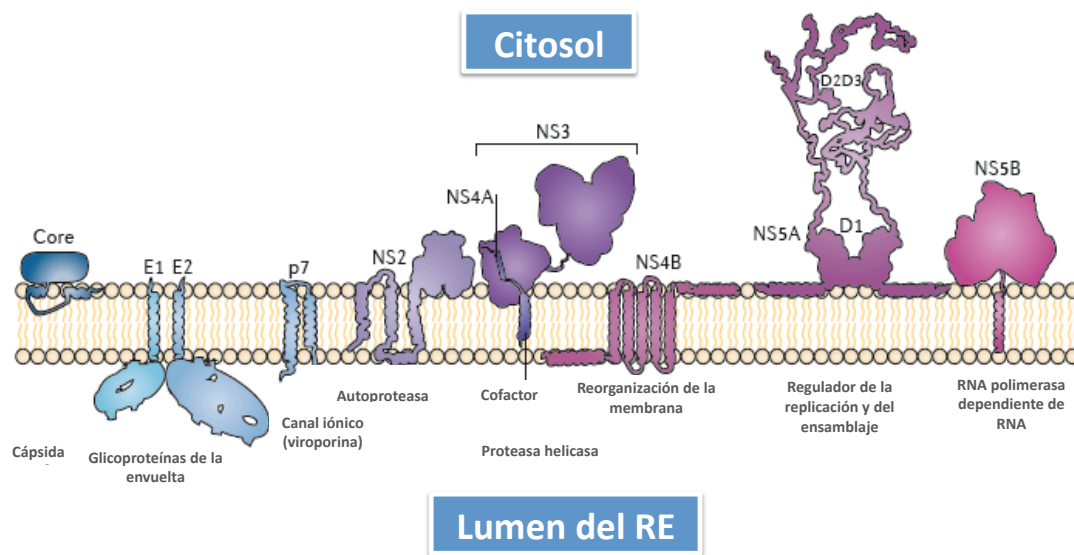
Es la proteína que forma la nucleocápsida viral. Entre esta proteína y la glicoproteína E1 existe una secuencia interna de señalización (de los aminoácidos 171 a 191 de la poliproteína) que permite que tenga lugar la escisión de ambas, de forma que E1 queda orientada hacia el lumen del retículo endoplasmático (RE) y el core inmaduro (191 aminoácidos) queda orientado hacia el citosol. Su posterior procesamiento en la región C-terminal da lugar a la proteína madura de 21-kDa (McLauchlan et al, 2002) (Fig. 2.4.3.1 y 2.4.3.2). La proteína core madura contiene varias hélices  $\alpha$  y se encuentra en las membranas del RE, en la web membranosa y en la superficie de las gotas lipídicas. Se ha propuesto que la interacción de la proteína core y las gotas lipídicas puede afectar al metabolismo de lípidos, siendo este uno de los factores que contribuyen a la esteatosis observada en pacientes infectados. La asociación a membranas a través del dominio D2 (hidrofóbico) puede tener un papel en la replicación del RNA y en la morfogénesis del virión (Boulant et al, 2006). En el dominio N-terminal de core abundan aminoácidos básicos implicados en unión al RNA y en oligomerización.

#### Glicoproteínas de la envuelta, E1 y E2.

Son proteínas glicosiladas que forman un complejo no covalente que constituye el pilar de la envuelta. Su maduración y plegamiento son procesos complejos en los que intervienen chaperonas del RE y que dependen de la formación de puentes disulfuro y de procesos de glicosilación. Los dominios hidrofóbicos transmembrana de E1 y E2, localizados en su región



C-terminal, están involucrados en la heterodimerización y el anclaje al RE (Fig. 2.4.3.2). E1 y E2 son las proteínas clave en la unión a los receptores celulares y en la fusión a la célula (Douam et al, 2014; Khan et al, 2014; Kong et al, 2013; Moradpour et al, 2007). En E2 se encuentra una región altamente heterogénea denominada región hipervariable I (HVR-I) que ha sido utilizada para estudios de diversidad genética de HCV.



**Figura 2.4.3.2. Localización en la membrana del retículo endoplásmico (RE) y funciones principales de las distintas proteínas de HCV.** Cada proteína está anclada a la membrana por uno o varios segmentos transmembranas o, en el caso de la proteína core y NS5A por hélices  $\alpha$  anfipáticas. NS3 está unida a la membrana a través de una hélice  $\alpha$  y del cofactor NS4A. Adaptado de (Bartenschlager et al, 2013).

#### p7.

Es un polipéptido de 63 aminoácidos que se escinde de manera poco eficiente de E2 y NS2, produciéndose por tanto la acumulación de los precursores E2-p7 y E2-p7-NS2 (Carrere-Kremer et al, 2004; Shanmugam & Yi, 2013). Tiene dos segmentos transmembrana conectados por un bucle citoplasmático corto, quedando los extremos N-terminal y C-terminal orientados hacia el lumen del RE. p7 no se requiere para la replicación *in vitro* pero es esencial para la infección *in vivo* (Sakai et al, 2003). Forma oligómeros y tiene actividad de canal catiónico lo que le sitúa en la familia de las viroporinas (Griffin et al, 2003; Pavlovic et al, 2003). Se ha descrito que tiene un importante papel en la maduración y liberación de partículas virales lo que le convierte en una diana atractiva para el diseño de agentes antivirales (Fig. 2.4.3.2).

#### Proteasa NS2-3.

Se denomina también autoproteasa. Su actividad catalítica reside en la zona C-terminal de NS2 y en el primer tercio N-terminal de la proteína NS3. Los residuos His143, Glu163 y Cys184 son esenciales para la actividad proteolítica (Grakoui et al, 1993; Hijikata et al, 1993).

NS2 interacciona con las membranas intracelulares a través de su región N-terminal (Fig. 2.4.3.2). La estructura obtenida por cristalografía ha permitido ver su organización en dímeros que incluyen dos sitios activos. Cada sitio activo está compuesto por residuos de los dos monómeros: His143 y Glu163 aportados por un monómero y Cys184 por el otro (Lorenz et al, 2006).

#### *Complejo NS3-4A.*

Es una proteína multifuncional, con actividad serin-proteasa (localizada en la región N-terminal) y RNA helicasa/NTPasa (localizada en la región C-terminal), ambas en NS3. NS4A actúa como un cofactor para NS3 serin-proteasa y es responsable de la asociación del complejo a la membrana celular (Fig. 2.4.3.2). Es una de las dianas para la terapia anti-HCV con antivirales de acción directa (Lamarre et al, 2003). Su triada catalítica está formada por los residuos His57, Asp81 y Ser139. La helicasa NS3 actúa sobre RNA de doble cadena y RNA de cadena sencilla con estructuras secundarias, llevando a cabo el desapareamiento de bases acoplado a hidrólisis de ATP (Wolk et al, 2000). HCV bloquea la respuesta inmune innata a través del procesamiento del adaptador mitocondrial de señalización antiviral (MAVS) y del activador de interferón asociado al receptor *Toll* (TRIF) por la proteasa NS3; esto da lugar a la inactivación de rutas de señalización importantes que podrían favorecer la persistencia del virus (Horner & Gale, 2013).

#### *NS4B.*

Es una proteína de 27 kDa poco caracterizada cuya principal función conocida es inducir la formación de una red membranosa que sirve como soporte para el complejo replicativo del virus (Egger et al, 2002; Romero-Brey et al, 2012). Además, junto con NS5A, promueve la fosforilación de la proteína AMPK (proteína quinasa activada por AMP) durante la infección alterando el estado energético y el metabolismo lipídico de la célula (Mankouri et al, 2010).

#### *NS5A.*

Es una proteína que puede encontrarse en una forma fosforilada basal (56 kDa) y otra forma hiperfosforilada (58 kDa). Hasta el momento se han descrito dos quinasas responsables de esta fosforilación como son la caseína-quinasa I (CKI) y la fosfatidilinositol 4-quinasa (PI4KIII $\alpha$ ) (Quintavalle et al, 2006; Reiss et al, 2013). La fosforilación de NS5A es importante para el ciclo replicativo de HCV (Reed et al, 1998). Mutaciones adaptativas a cultivos celulares, localizadas en proteínas como NS5A y NS4B, afectan frecuentemente a la hiperfosforilación de NS5A. La pérdida de ese estado hiperfosforilado se ha relacionado con un incremento de la eficiencia replicativa del virus (Appel et al, 2005; Evans et al, 2004; Neddermann et al, 2004). Se

encuentra anclada a la membrana con la zona polar de la proteína expuesta a la cara citosólica lo que permite la interacción proteína-proteína que es imprescindible para la formación de un complejo replicativo funcional (Penin et al, 2004). También interacciona con el RNA viral y proteínas del hospedador (Huang et al, 2005; Love et al, 2009; Tellinghuisen et al, 2005). Entre sus funciones es de vital importancia la protección que ejerce sobre el RNA viral frente a la acción de RNAsas y frente a mecanismos de defensa antiviral disparados por la presencia de dsRNA. Los mecanismos de regulación de la traducción, replicación y empaquetamiento no se conocen aun completamente, aunque se sabe que NS5A actúa como interruptor entre replicación y procesos subsiguientes, acción que depende de su nivel de fosforilación (Neddermann et al, 2004; Tellinghuisen et al, 2008). Además, en NS5A se localizan dos regiones importantes que afectan a la respuesta al tratamiento con interferón- $\alpha$  pegilado (pegIFN- $\alpha$ ) y ribavirina, denominadas IRRDR (región determinante de la resistencia a interferón y ribavirina) e ISDR (región determinante de la sensibilidad a interferón) (El-Shamy et al, 2007; Enomoto et al, 1996).

#### **NS5B.**

Es la RdRp de HCV que cataliza la replicación del RNA vírico. Como otras polimerasas, tiene una forma que recuerda a una mano derecha, con dominios fingers, thumb y palm (Ago et al, 1999; Bressanelli et al, 2002; Lesburg et al, 1999). Contiene los residuos catalíticos GDD en su centro activo. Es una proteína asociada a la membrana celular por 21 aminoácidos del extremo C-terminal (Fig. 2.4.3.2). Estos residuos son prescindibles para la actividad polimerasa *in vitro*, pero no en cultivos celulares (Moradpour et al, 2004). Esta polimerasa carece de actividad *Exo 3'-5'* e introduce transiciones preferentemente a transversiones (Powdrill et al, 2011). Es una importante diana antiviral.

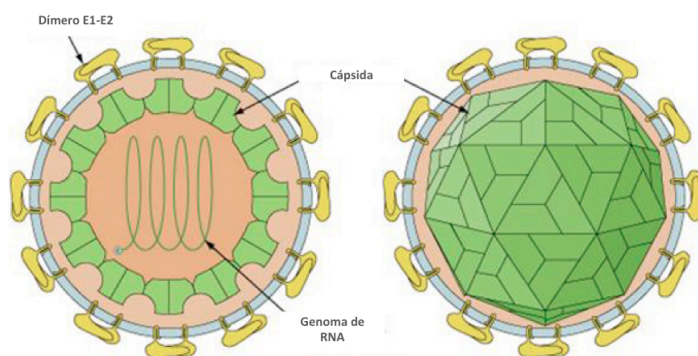
#### **Proteínas ARFP/F.**

Se han identificado marcos de lectura abierta alternativos en la región codificante del core del genotipo 1a, pero las funciones de las proteínas codificadas no están claras (Branch et al, 2005; McMullan et al, 2007).

### **2.4.4. Estructura del virión y ciclo de vida.**

La nucleocápsida viral, compuesta por la proteína core y el RNA, está rodeada por una envuelta lipídica donde se encuentran embebidas las glicoproteínas E1 y E2 (Fig. 2.4.4) (Bassendine et al, 2011; Gastaminza et al, 2010). El virión de HCV circula como lipopartículas debido a su asociación a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL), libre o unido a inmunoglobulinas, lo que le hace adoptar formas pleiomórficas y heterogéneas

(Andre et al, 2002; Catanese et al, 2013; Gastaminza et al, 2010; Merz et al, 2011; Wakita et al, 2005). El virus se une a la superficie celular e interacciona con diversos receptores. Los de baja afinidad, a los que se une primero la partícula viral, son los receptores de LDL (LDLR) y los glicosaminoglicanos (GAG) (Agnello et al, 1999; Barth et al, 2003). A continuación, las proteínas E1 y E2 interaccionan con los receptores scavenger clase B tipo I (SR-BI) y la tetraspanina (CD81) (Pileri et al, 1998; Scarselli et al, 2002). Otros factores como ocludina (OCLN) y claudina-1 (CLDN1) se requieren también para la entrada en la célula (Evans et al, 2007; Ploss et al, 2009). La internalización ocurre a través de endocitosis mediada por clatrina (Blanchard et al, 2006) y culmina con la liberación del genoma dentro del citosol para que tenga lugar la traducción viral. La transmisión directa célula-célula a través de uniones estrechas sin liberación de partículas al medio extracelular es importante en el ciclo infeccioso de HCV y este modo de transmisión podría evitar la neutralización del virus por anticuerpos circulantes (Timpe et al, 2008).



**Figura 2.4.4. Esquema de la estructura del virión de HCV.** Esquema simplificado a partículas esféricas (50-80 nm de diámetro). Adaptado de la web Viralzone (Swiss Institute of Bioinformatics).

La traducción del RNA para dar la poliproteína es dependiente de IRES y se realiza en asociación con el RE. La subunidad 40S del ribosoma se une al IRES. A continuación se forma el complejo 48S mediante la unión de eIF3 y del complejo ternario eIF2, Met-tRNA y GTP. El tercer paso, que es limitante de la velocidad de la traducción, es la asociación de la subunidad ribosomal 60S dependiente de GTP para formar el complejo 80S, que inicia la síntesis de la poliproteína (Otto & Puglisi, 2004). Las proteínas estructurales y el polipéptido p7 son procesados por la peptidasa señal del RE, y las proteínas no estructurales por las dos proteasas virales NS2-3 y NS3-4A (Fig. 2.4.3.1).

La formación del complejo replicativo, constituido por proteínas y RNA viral, tiene lugar asociado a membranas como ocurre en los virus RNA de polaridad positiva estudiados hasta la fecha (Mackenzie, 2005). En el caso de HCV el origen de esta membrana es el RE, y se le llama específicamente red membranosa (Gosert et al, 2003), cuya formación es inducida por NS4B y NS5A (Egger et al, 2002; Romero-Brey et al, 2012). Las membranas lipídicas actúan como soporte físico permitiendo la correcta organización del complejo de replicación (Lyle et

al, 2002), la compartimentación y la concentración local de proteínas virales (Schwartz et al, 2002). Además aportan protección al RNA vírico frente a las defensas del hospedador y la interferencia mediada por RNA (Miyanari et al, 2003). Hay proteínas celulares que juegan un papel relevante en replicación y procesamiento de la poliproteína, una de las más estudiadas es la ciclofilina A (Kaul et al, 2009).

Se ha visto que hay una compleja interacción entre la replicación de HCV y el metabolismo lipídico de la célula. Por ello se piensa que la manipulación farmacológica del metabolismo lipídico podría tener potencial terapéutico (Sakamoto et al, 2005). Dentro de este metabolismo destaca, entre otras, la enzima AMPK que actúa como regulador metabólico controlando el estado energético de la célula y la síntesis y degradación de lípidos. Esta proteína en su estado activado inhibe la síntesis y acumulación de grasas y además, la replicación de HCV (Mankouri et al, 2010).

Los viriones son producidos en el RE, o compartimentos derivados de éste, a partir de los cuales se produce la secreción al exterior celular. Se conoce poco sobre el empaquetamiento, ensamblaje y la liberación de los viriones, aunque las proteínas NS2, E1, E2, p7, NS3 y NS5A están implicadas (Jirasko et al, 2010; Popescu et al, 2011).

## **2.5. Situación actual del tratamiento contra HCV.**

No hay vacunas disponibles para prevenir la infección y las enfermedades causadas por HCV, y el tratamiento estándar usado hasta el año 2011 ha sido la combinación de pegIFN- $\alpha$  y R. Este tratamiento produce una respuesta virológica sostenida (RVS) en el 80% de los pacientes infectados con los genotipos 2 o 3, pero sólo en un 50% de los pacientes infectados con genotipos 1 y 4 (Chevaliez & Pawlotsky, 2007; Fried et al, 2002; Ghany et al, 2009; Hadziyannis et al, 2004; Williams, 2006). Otros genotipos, como el 5 y el 6, muestran una respuesta intermedia al tratamiento. La terapia conlleva efectos secundarios severos, como síntomas gripales (fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, dolores musculares), cansancio, depresión, alopecia y anemia. Por ello, existe una necesidad urgente de desarrollar otro tipo de terapias más efectivas y mejor toleradas. Recientemente las terapias triples, que incluyen antivirales de acción directa de nueva generación denominados DAAs “directly acting antiviral agents” como son los inhibidores de la NS3 telaprevir o boceprevir, han aumentado la RVS hasta un 70% en pacientes *naïve* (no sometidos a tratamiento previo) infectados con genotipo 1 (Kwong et al, 2011; Lange et al, 2010; McHutchison et al, 2009; Poordad et al, 2011). Uno de los objetivos es proporcionar a cada paciente una terapia personalizada y eliminar el pegIFN- $\alpha$  del tratamiento (Scheel & Rice, 2013). A pesar de los efectos secundarios que presenta el

tratamiento con R su administración parece de momento indispensable para conseguir RVS (Feld, 2012; Hezode et al, 2009; Thomas et al, 2012).

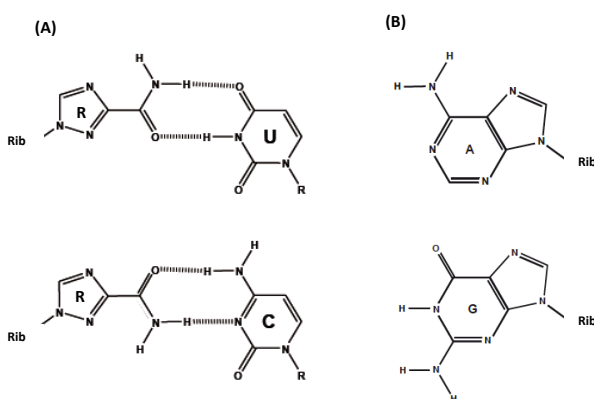
Varios factores del hospedador (HLA, etnia, género, edad, grado de obesidad, etc.) influyen en la eliminación del virus de forma natural y en la respuesta a la terapia. Además, altos niveles basales de genes estimulados por interferón (ISGs) predicen una respuesta desfavorable al tratamiento (Kau et al, 2008). Algunos polimorfismos (SNPs), como uno próximo al locus *IL28B* (recientemente denominado *IFNL3*) que codifica el interferón  $\lambda 3$  (IFN- $\lambda 3$ ), influyen en la evolución de la infección y la respuesta al tratamiento; pacientes con la variante favorable de este SNP presentan niveles de expresión de interferón  $\lambda 3$  mayores y menor expresión de los ISGs antes del tratamiento (Horner & Gale, 2013; McGilvray et al, 2012).

## 2.6 Agentes antivirales frente a HCV.

### 2.6.1. Ribavirina.

#### 2.6.1.1. Estructura y metabolismo de la ribavirina.

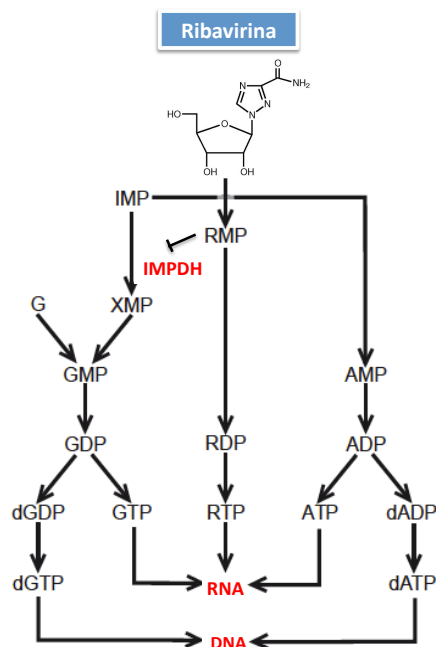
La ribavirina (R), 1- $\beta$ -D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida o Virazol es un agente antiviral de amplio espectro que puede actuar como análogo de purinas durante la síntesis del RNA y como agente inhibidor de la síntesis de RNA, DNA y proteínas (Muller et al, 1977). Como agente mutagénico puede aparear tanto con U como con C (Fig. 2.6.1).



**Figura 2.6.1. A) Apareamiento de R con U y C.** Se representa el anillo de imidazol modificado de la ribavirina (R), con el anillo de la ribosa abreviado como Rib. Los apareamientos tanto con U como con C se producen por la formación de una estructura del tipo Watson-Crick. **B) Estructura molecular de la adenosina (A) y la guanosina (G).**

La adenosina quinasa (AK) fosforila a la R generando la ribavirina-5'-monofosfato (RMP), que por acción de las nucleósido mono- y bifosfato quinasas, produce ribavirina-5'-difosfato (RDP) y ribavirina-5'-trifosfato (RTP) (Balzarini et al, 1993; Gallois-Montbrun et al, 2003; Willis et al, 1978). La RMP inhibe competitivamente la inosín monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) lo que altera las rutas de biosíntesis de nucleótidos en las que esta enzima actúa (Streeter et al, 1973) (Fig. 2.6.2). Se ha demostrado que la RTP puede ser

incorporada al RNA en síntesis en numerosos virus, como el virus West Nile (Jordan et al, 2000), Hantaan (Chung et al, 2007; Severson et al, 2003), LCMV (Moreno et al, 2011) y numerosos picornavirus (Airaksinen et al, 2003; Crotty et al, 2001; Crotty et al, 2000; Sierra et al, 2007).



**Figura 2.6.2. Metabolismo de la ribavirina.** Esquema de algunas rutas del metabolismo de nucleótidos purínicos y el efecto de la ribavirina. La forma monofosfato de R (RMP) inhibe la inosín monofosfato deshidrogenasa (*IMPDH*), reduciendo la cantidad de GTP y alterando el balance de nucleótidos intracelulares, mientras que la RTP puede incorporarse a la nueva cadena de RNA sintetizada. La incorporación de guanosina exógena permite que tenga lugar la síntesis de nucleótidos derivados de G a partir de procesos de fosforilación Adaptado de (Airaksinen et al, 2003).

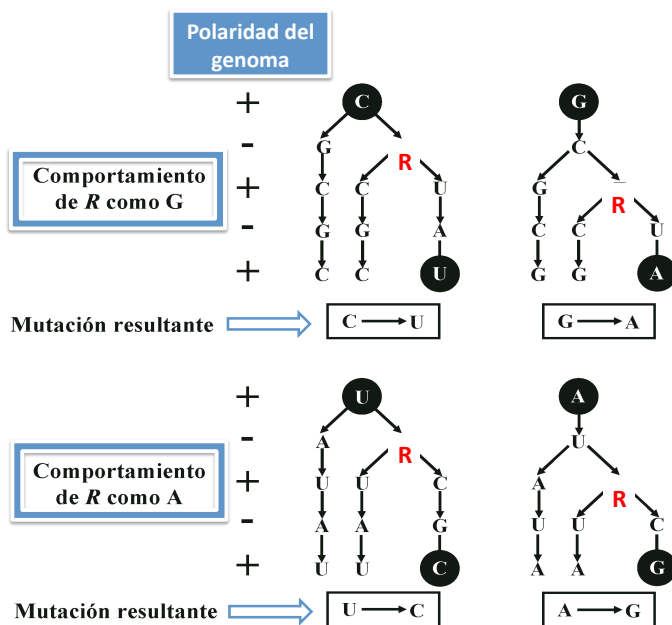
La estructura molecular de la R es similar a la de A y G, de modo que una vez incorporada a la cadena de RNA, la R puede aparear con C o U (Figs. 2.6.1 y 2.6.3). Las principales mutaciones causadas por R serán C→U y G→A (en caso de que R se comporte mayoritariamente como G) o U→C y A→G (en caso de que se comporte mayoritariamente como A).

En nuestro laboratorio hemos descrito que el sesgo mutacional de R en FMDV (Agudo et al, 2010; Airaksinen et al, 2003; Perales et al, 2011; Sierra et al, 2007) y en HCV (Ortega-Prieto et al, 2013) es a favor de las transiciones C→U y G→A.

### 2.6.1.2. Mecanismos antivirales propuestos para la ribavirina en virus RNA.

- **Inhibición de la inosín monofosfato deshidrogenasa.**

En un primer momento se pensó que el carácter antiviral de la R se debía al desbalance de los nucleótidos derivados de la guanosina (GMP, GDP y GTP) que tenía lugar por la inhibición que ejercía la RMP sobre la enzima *IMPDH* (Streeter et al, 1973) (Fig. 2.6.2). La bajada de los niveles nucleotídicos puede afectar negativamente a numerosos procesos del ciclo viral y del metabolismo de la célula huésped. En particular, la falta de disponibilidad de GTP puede provocar la aparición de errores por incorporación de otros nucleótidos en lugar de GTP, lo que se traduce en un incremento en la frecuencia de mutación (Airaksinen et al, 2003; Stuyver et al, 2002). La incorporación de guanosina exógena al medio de cultivo atenúa o elimina el efecto antiviral ejercido por la R, generalmente a través del incremento de GTP intracelular (Airaksinen et al, 2003; Chung et al, 2007; Jordan et al, 2000; Ortega-Prieto et al, 2013; Scheidel et al, 1987; Streeter et al, 1973; Wray et al, 1985a; Wray et al, 1985b).



**Figura 2.6.3 Mutaciones producidas por la incorporación de R durante la síntesis de RNA.** Los nucleótidos se abrevian como A, U, G, C y R. R puede aparear con C (comportándose como G) y con U (comportándose como A). Se describen dos ciclos de síntesis de cadena positiva (+) y negativa (-). Dependiendo de si R se incorpora a la cadena positiva o negativa se producen mayoritariamente transiciones  $A \rightarrow G$  y  $G \rightarrow A$  o  $U \rightarrow C$  y  $C \rightarrow U$ , respectivamente.

- **Mutagénesis por incorporación directa a la cadena en síntesis.**

El carácter mutagénico de R fue demostrado por primera vez en PV (Crotty et al, 2000). Más tarde, en nuestro laboratorio, se demostró el carácter mutagénico de R para FMDV y LCMV (Agudo et al, 2010; Airaksinen et al, 2003; Ferrer-Orta et al, 2010; Moreno et al, 2011; Sierra et al, 2007).

- **Inhibición independiente de mutagénesis y carácter inmunomodulador.**

En determinados estudios se ha observado una actividad inhibitoria sobre la polimerasa viral distinta de la mutagénesis incrementada. Por ejemplo, la R en cualquiera de sus formas fosforiladas inhibe la transcripción de VSV *in vitro*. Esta inhibición sin embargo, no se debe a la incorporación de R durante la síntesis de la nueva hebra de RNA ni a la actuación de R como terminadora de cadena (Fernandez-Larsson et al, 1989; Toltzis et al, 1988). En el caso del virus de la gripe, la RTP afecta a la formación y posterior elongación del oligonucleótido cebador de la replicación del RNA (Wray et al, 1985a). Por último se ha observado que puede actuar como terminador de cadena sobre HCV cuando se incorporan varios residuos de RMP en la nueva cadena de RNA (Vo et al, 2003).

La mayor parte de los RNAm celulares poseen en su extremo 5' una estructura (*cap*) que incluye 7-metil-guanosina, que confiere estabilidad y permite su traducción. Al ser R un análogo de G, puede interferir con la maquinaria responsable de la formación del *cap* provocando inhibición de la multiplicación viral. Este mecanismo podría afectar sólo de modo indirecto (a través de la inhibición de RNAm celulares) a virus como HCV ya que el RNAm vírico carece de *cap* (Benarroch et al, 2004; Bougie & Bisailon, 2004; Goswami et al, 1979; Wray et al, 1985a; Zhou et al, 2003).



Generalmente, la infección por HCV acaba siendo crónica y se ha observado que una de las causas posibles de la cronificación es la activación de la respuesta inmune por células *T-Helper* tipo 1. Se ha observado que en pacientes infectados con HCV que están siendo tratados con la terapia estándar con peg-IFN y R se induce la transformación de las células *T-Helper* tipo 2 a tipo 1, algo que no ocurre cuando un paciente se trata exclusivamente con IFN (Hultgren et al, 1998; Ning et al, 1998). Por tanto, la actividad anti-VHC de R puede deberse parcialmente a su capacidad inmunomoduladora.

#### **2.6.1.3. Efecto de la ribavirina en HCV.**

Varios de los mecanismos resumidos anteriormente se han propuesto para la acción de R durante el tratamiento de infecciones por HCV (Feld & Hoofnagle, 2005) pero no existe un consenso sobre cual de ellos puede ser el más relevante (Dixit & Perelson, 2006; Feld, 2012). Hay evidencias que demuestran que la RTP puede ser incorporada durante la replicación del genoma de HCV en el lugar de ATP o GTP (Graci & Cameron, 2008) pero hay controversia sobre si R es o no un agente mutagénico para HCV (Asahina et al, 2005; Chevaliez et al, 2007; Contreras et al, 2002; Cuevas et al, 2009; Dietz et al, 2013; Dixit et al, 2004; Gerotto et al, 1999; Hofmann et al, 2007; Kanda et al, 2004; Lutchman et al, 2007; Mori et al, 2011; Quereghni et al, 2001; Sookoian et al, 2001; Vo et al, 2003; Zhou et al, 2003). Como parte de esta tesis doctoral hemos demostrado que R es mutagénica para HCV cuando replica en células de hepatoma humano (Ortega-Prieto et al, 2013).

#### **2.6.1.4. Resistencia a ribavirina en HCV.**

Los inhibidores, como R, que actúan como análogos de nucleósidos/nucleótidos suelen tener una barrera alta a la resistencia. Normalmente, las mutaciones de resistencia a este tipo de drogas conllevan una pérdida de sensibilidad parcial al agente antiviral y una considerable reducción de la capacidad replicativa (barrera fenotípica) (McCown et al, 2008; Sarrazin & Zeuzem, 2010). Esto contrasta con las mutaciones de resistencia que se seleccionan para inhibidores de la proteasa NS3/4A y algunos inhibidores no nucleosídicos, que afectan poco a la capacidad replicativa a pesar de conferir un grado de resistencia a la droga alto (Pawlotsky, 2009).

La primera sustitución de resistencia a R descrita para HCV fue F415Y en NS5B, seleccionada en pacientes sometidos a monoterapia con R (Young et al, 2003). Tras pases seriados de células que contenían un replicón del genotipo 2a en presencia de R, se observó una reducción de la sensibilidad a la droga asociada a la sustitución Y33H en la proteína NS5B,

que produjo además una bajada en la capacidad replicativa del virus (Hmwe et al, 2010). Usando la variante del virus J6/JFH1 se generaron poblaciones resistentes a R que incluían mutaciones sinónimas y no sinónimas, pero las mutaciones responsables de la resistencia no fueron identificadas (Feigelstock et al, 2011). Aunque la polimerasa NS5B es la proteína en la que se espera que mapeen las sustituciones de resistencia a R, en líneas celulares que sostienen replicones subgenómicos de HCV se han descrito otros mecanismos de resistencia a R. Uno de ellos es la selección de células defectivas en importinas, las proteínas que median en la entrada de R en la célula, y otro es la presencia de sustituciones en NS5A (G404S y E442G), quizás por su participación en la replicación del RNA (Ibarra & Pfeiffer, 2009; Pfeiffer & Kirkegaard, 2005b). Es decir, los datos disponibles apuntan a distintos posibles mecanismos a nivel viral y celular que confieren sensibilidad reducida a R.

### **2.6.2. Guanosina, un metabolito con acción inhibidora sobre HCV.**

La guanosina se fosforila a GMP (guanosín monofosfato), cGMP (guanosín monofosfato cíclico), GDP (guanosín difosfato) y GTP (guanosín trifosfato) y todos estos derivados tienen varias actividades biológicas. En esta tesis se ha hecho la observación inesperada de que la guanosina, añadida al medio de cultivo de células de hepatoma humano infectadas por HCV, inhibe la replicación del virus. Ello introduce un nuevo aspecto en los diseños antivirales basados en mutagénesis letal ya que implica que metabolitos naturales podrían contribuir también al descenso de carga viral y la extinción del virus.

En el momento de redactar esta Tesis Doctoral se están realizando ensayos clínicos para la implementación de nuevos tratamientos contra el HCV. Ello ocurre a la par que la mutagénesis letal se investiga como un nuevo diseño terapéutico contra virus RNA que basan su capacidad adaptativa en la dinámica de cuasiespecies. La mutagénesis letal constituye una alternativa para evitar la aparición de mutantes de escape a otras drogas usadas en terapia. Además, no se ha aclarado si la R ejerce su acción anti-HCV principal como agente mutagénico *in vivo*, lo que convertiría al tratamiento estándar contra este virus en un caso de aplicación clínica de mutagénesis letal sin que la comunidad científica se hubiera percatado de ello. En este contexto, en la presente Tesis Doctoral se han planteado los objetivos que se indican a continuación.

### **3. Objetivos.**

En la presente Tesis Doctoral se han planteado los objetivos siguientes:

1. Estudio del carácter mutagénico de la ribavirina en el sistema de pases seriados del virus de la hepatitis C en células de hepatoma humano y consecuencias para la supervivencia del virus.
2. Estudio del carácter antiviral del nucleósido guanosina sobre el virus de la hepatitis C.



## 4. Materiales y métodos.

### 4.1. Cultivos de células eucariotas.

Para las infecciones con HCV se emplearon las líneas celulares de hepatoma humano Huh-7 Lunet, Huh-7.5 y Huh-7.5 reporter.

- **Células Huh-7 Lunet.**

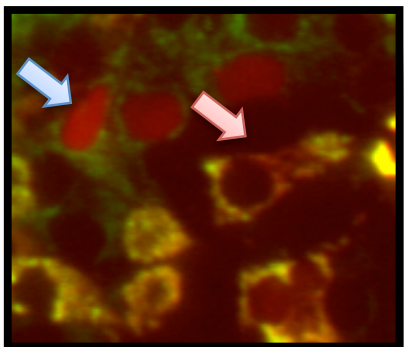
Son un clon de las células Huh-7 que derivan de una línea de hepatocarcinoma de un varón japonés de 57 años (Nakabayashi et al, 1982). Son permisivas a la infección de algún aislado de HCV (Blight et al, 2002) y difieren de las Huh-7.5 en el nivel de expresión del receptor CD81 (Koutsoudakis et al, 2007). Se usan principalmente para protocolos de electroporación.

- **Células Huh-7.5.**

Las células Huh-7.5 son un clon de las Huh-7 y se caracterizan por ser más permisivas a la infección por HCV, debido a la inactivación del gen inducible por ácido retinoico-I (RIG-I), ruta esencial para la respuesta inmune innata (Sumpter et al, 2005).

- **Células Huh-7.5 reporter.**

Son células Huh-7.5 modificadas genéticamente que constituyen una herramienta para observar infecciones *in vivo* o en células fijadas utilizando el microscopio de fluorescencia (Jones et al, 2010). Están transducidas de forma estable con lentivirus que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) y la proteína roja fluorescente (RFP). La RFP se encuentra fusionada a una señal de localización nuclear que solo queda expuesta al medio tras la escisión de un fragmento aminoacídico por la proteasa NS3-4A de modo que el RFP cambia de localización subcelular (de citoplasma a núcleo) cuando las células están infectadas por HCV (Fig. 4.1.).



**Figura. 4.1. Células Huh-7.5 reporter.** Se muestran células infectadas (flecha azul) y no infectadas (flecha rosa) al microscopio óptico de fluorescencia.

---

Todas las titulaciones de HCV se han realizado empleando las células Huh-7.5 y las infecciones productivas (un pase o varios pases de virus) se

han realizado con células Huh-7.5 reporter.

Todas las líneas celulares se mantuvieron en cultivo a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> utilizándose el medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO® Cat n° 11960-044) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, aminoácidos no esenciales a 0.1 mM, glutamina a 2 mM y una mezcla de antibióticos, gentamicina y antimicótico (DMEMc) (Blight et al, 2002; Jones et al, 2010). Las líneas celulares se trataron con tripsina-EDTA (Sigma) antes de ser subcultivadas.

Las infecciones con otros virus (LCMV, VSV y FMDV) se llevaron a cabo en células BHK-21. Estas células son fibroblastos de riñón de hamster (Stoker & Macpherson, 1964) que fueron clonadas por dilución límite (de la Torre et al, 1988). Las células se crecieron como se describe en Domingo y cols (Domingo et al, 1980) y se cultivaron hasta la confluencia a 37°C y 7% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.1.1. Congelación y almacenamiento de células.**

Las células se congelaron en criotubos (Nunc) empleando una mezcla que contenía 90% SFB y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma) a una densidad aproximada de 10<sup>6</sup> células/ml. Los criotubos se mantuvieron a -80 °C durante 24 horas, y posteriormente se trasladaron a nitrógeno líquido.

#### **4.1.2. Descongelación de células.**

Las células contenidas en criotubos almacenados en nitrógeno líquido se descongelaron en un baño de 37 °C y se transfirieron a tubos de plástico (Falcon) de 15 ml que contenían 5 ml de DMEM calentado a 37 °C. Tras una breve agitación se centrifugaron a 1200 r.p.m durante 5 min a temperatura ambiente en una centrífuga de mesa Rotina 46R (Hettich). Se eliminó el sobrenadante y se disgregó el sedimento de células mediante suave agitación del tubo. A continuación, las células se resuspendieron en 10 ml de DMEM suplementado con SFB al 10% y se distribuyeron en placas de 100 mm de diámetro (p100, Nunc). Después de su incubación en las condiciones anteriormente descritas, las células alcanzaron la confluencia entre las 40 y las 48 horas.

## 4.2. Virus utilizados.

En este trabajo se han utilizado los siguientes virus:

- **HCV.**

El virus de la hepatitis C empleado es una quimera de los aislados J6 y JFH-I denominado HCVcc [Jc1FLAG2 (p7-nsGluc2A)] que replica eficientemente en células hepáticas (Marukian et al, 2008). Como control negativo se utilizó el virus GNN [GNNFLAG2(p7-nsGluc2A)] que contiene una mutación en la polimerasa viral, NS5B, que le hace ser defectivo en replicación (Marukian et al, 2008).

- **Otros virus.**

Se han utilizado VSV cepa Mudd-Summers del serotipo Indiana (Mudd et al, 1973), FMDV obtenido a partir del clon infeccioso CS8cI (Sobrino et al, 1983) y LCMV Armstrong 53b (LCMV Arm53) (Matloubian et al, 1993).

## 4.3. Compuestos empleados.

Los compuestos empleados fueron Ribavirina (R, Sigma), ácido micofenólico (MPA, Sigma) y los nucleósidos adenosina, citidina, uridina y guanosina (Ade, Cit, Uri y Gua, Sigma). Para la preparación de los medios conteniendo el compuesto correspondiente se partió de disoluciones de R, MPA y nucleósidos a 100 mM, 50 mg/ml y 800  $\mu$ M preparados en PBS, metanol y DMEMc, respectivamente. Las disoluciones se esterilizaron por filtración, se conservaron congeladas a -80 °C y se diluyeron en DMEMc a la concentración requerida en cada experimento. Las células Huh-7.5 reporter se pretrataron con la droga correspondiente 16 horas antes de la infección para permitir la absorción e incorporación de la misma a la célula.

## 4.4. Concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>).

La toxicidad de cada uno de los compuestos se midió en células Huh-7.5 reporter y BHK-21, sembradas en placas de 96 pocillos al 70% de confluencia. Las células se expusieron durante 72 horas a un rango de concentraciones de cada compuesto que no superó los 250  $\mu$ M para R, 100  $\mu$ M para MPA y 800  $\mu$ M para cada uno de los nucleósidos. Tras ese tiempo se añadió MTT (*metil tiazol tetrazolio*) a cada pocillo a una concentración final de 500  $\mu$ g/ml y las células se incubaron a 37 °C durante 4 horas. A continuación se añadieron 100  $\mu$ l de DMSO y se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 550 nm. La CC<sub>50</sub> (la

concentración de una droga que produce la muerte del 50% de las células) se calculó a partir de 4 determinaciones distintas (Vandamme et al, 2000).

#### **4.5. Concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>).**

La actividad inhibitoria de cada una de las drogas se midió en células Huh-7.5 reporter y BHK-21, sembradas en placas de 24 pocillos al 70% de confluencia. Las células se infectaron a una MOI de 0,05-0,2 TCID<sub>50</sub>/ml o PFU/ml y se expusieron durante 72 horas a un rango de concentraciones de cada compuesto que no superó los 150  $\mu$ M para R, 10  $\mu$ M para MPA y 800  $\mu$ M para cada uno de los nucleosidos. La IC<sub>50</sub> (la concentración de una droga que produce una bajada de la infectividad a la mitad) se calculó a partir de tres determinaciones independientes considerando los controles no tratados como el 100% de infectividad.

#### **4.6. Infecciones virales.**

##### **4.6.1 Producción de progenie viral de HCV.**

Los procedimientos utilizados para preparar el virus de partida HCVp0 se han descrito previamente (Perales et al, 2013). De manera resumida, las células Huh-7 Lunet se electroporaron con 10  $\mu$ g de RNA infeccioso de HCVcc o del control negativo GNN (260 voltios, 950  $\mu$ F). La transcripción *in vitro* de HCVcc y GNN se realizó utilizando el kit T7 RiboMAX™ Express RNAi System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células electroporadas fueron subcultivadas, antes de que alcanzaran la confluencia, cada 3-4 días hasta un máximo de 30 días después de la electroporación. Finalmente, los sobrenadantes de los días 17 a 24 post-electroporación fueron concentrados 20 veces usando columnas de centrifugación 10,000 MWCO (Millipore) tal y como indican las instrucciones del fabricante y se conservaron en alícuotas a -80° C.

Con este preparado viral se infectaron células Huh-7.5 reporter a una MOI de 0.5 TCID<sub>50</sub>/célula y 3-4 días más tarde se subcultivaron. Después de una segunda infección y dos pases de células adicionales, el virus obtenido fue denominado HCVp0 y es el empleado en esta Tesis Doctoral.

##### **4.6.2. Pases seriados de HCV.**

Las células Huh-7.5 reporter se sembraron 24 horas antes de cada infección y el número de células sembradas se estimó en función del tipo de placa utilizada en cada caso



para alcanzar la confluencia del pocillo al final de la infección (3-4 días). En el caso de una p100, el tipo de placa que se utilizó en la mayoría de experimentos de esta Tesis, se sembraron  $2 \times 10^6$  células en cada placa. Para iniciar los pases seriados, las células se infectaron a una MOI determinada (generalmente 0,05-0,2 TCID<sub>50</sub>/ml) durante 5 horas (tiempo de adsorción) y la infección se prolongó durante 3-4 días. En pases sucesivos las nuevas monocapas se infectaron con 2,5 ml de sobrenadante del pase anterior. Para asegurar la ausencia de contaminación durante los experimentos se mantuvieron monocapas infectadas con el virus GNN (deficiente en replicación) en paralelo. La titulación de estas placas confirmó la ausencia de infectividad y por lo tanto la ausencia de contaminación.

#### **4.6.3. Titulación de HCV.**

El título viral de HCV se determinó calculando la TCID<sub>50</sub>/ml (dosis infecciosa necesaria para infectar el 50% de las células en un cultivo celular) (Reed & Muench, 1938). Las células Huh-7.5 se sembraron 24 horas antes de las infecciones en placas de 96 pocillos previamente tratadas con poli-L-Lisina a 100 µg/ml (Sigma P-2636) (6400 células/pocillo). Se realizaron diluciones seriadas del virus a titular (generalmente  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) y se infectaron las células con 100 µl/pocillo (8 pocillos/dilución). Tres días después de la infección se retiró el medio, se lavaron las monocapas con PBS y se fijaron con metanol a -20 °C (50 µl/pocillo).

A continuación se realizó un protocolo de inmunotinción frente a la proteína viral NS5A ya que este virus no produce efecto citopático. Para ello se retiró el metanol, se lavó la placa dos veces con PBS y una con PBS-Tween y se incubó con tampón de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente (50 µl/pocillo). Seguidamente se bloqueó la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (50 µl/pocillo) durante 5 minutos y se lavó la placa dos veces con PBS y una vez con PBS-Tween. Después se incubó durante una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo primario monoclonal frente a NS5A (9E10, producido en el laboratorio del Dr. Charles Rice) diluido 1:3000 en PBS-Tween (40 µl/pocillo) y se lavó la placa dos veces con PBS y una con PBS-Tween. El siguiente paso consistió en una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario ( $\alpha$ -mouse HPR polymer, ImmPRESS™-Vector Labs) diluido 1:3 en suero de caballo al 2,5% en PBS. Finalmente, tras otro lavado similar a los anteriores, se incubó la placa durante 3-5 minutos a temperatura ambiente con una solución DAB al 0,05% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,02% en PBS (40 µl/pocillo), se retiró la solución, se lavó la placa una vez con PBS y se añadieron 200 µl adicionales del tampón (Lindenbach et al, 2005).

#### **4.6.4. Infecciones y titulaciones de VSV, FMDV y LCMV.**

Los métodos de infección de células BHK-21 y los controles para asegurar la ausencia de contaminaciones (mantenimiento de cultivos no infectados en paralelo) han sido descritos previamente (Baranowski et al, 1998). Para las infecciones con VSV o FMDV la confluencia fue del 100% y para las infecciones con LCMV la confluencia de las células fue del 70% al 90% siguiendo métodos establecidos en nuestro laboratorio (de la Torre et al, 1987; Domingo et al, 1980; Grande-Pérez et al, 2002; Sobrino et al, 1983).

Para la determinación del título viral de FMDV y VSV (PFU/ml) se realizaron infecciones en células BHK-21 en medio semisólido (Domingo et al, 1980; Sierra et al, 2007). Se infectaron  $2-4 \times 10^6$  células BHK-21 (en placas de p60) con 500 µl de inóculo de diluciones seriadas del sobrenadante a determinar. Las diluciones se realizaron en DMEMc sin SFB. Tras 60 minutos de adsorción a 37 °C y 7% de CO<sub>2</sub>, se retiró el inóculo y se añadió medio semisólido (50% de DMEM 2x, 48% de agar al 1%, 1% de SFB y 1% de DEAE-dextrano). Después de 24 horas de incubación, se fijaron las células con formaldehído al 2% y se tiñeron con cristal violeta (2% de cristal violeta en formaldehído al 2%). Todas las titulaciones se realizaron por triplicado.

Para la determinación del título viral de LCMV se realizaron infecciones en células Vero en medio semisólido (Grande-Pérez et al, 2002). Se infectaron las células a una confluencia del 70-90% (en placas M6) con 300 µl de inóculo de diluciones seriadas del sobrenadante a determinar. Las diluciones se realizaron en DMEMc sin SFB. Tras 90 minutos de adsorción a 37 °C y 7% de CO<sub>2</sub>, se retiró el inóculo y se añadió medio semisólido (50% de DMEM 2x, 46% de agar al 0.6%, 1% de SFB, 1% de DEAE-dextrano y 2% de glutamina). Después de 7 días de incubación, se fijaron las células con formaldehído al 2% y se tiñeron con cristal violeta (2% de cristal violeta en formaldehído al 2%). Todas las titulaciones se realizaron por triplicado.

#### **4.7. Extracción de RNA viral.**

El RNA intracelular fue extraído a partir de cultivos celulares usando primero el kit QIAshredder® y a continuación el kit RNeasy® Mini siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA, USA).

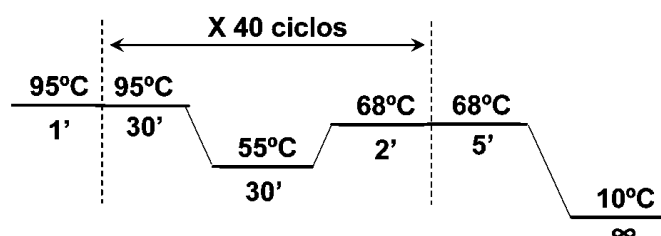
El RNA extracelular fue extraído a partir de sobrenadantes de cultivos celulares usando el kit *QIAamp® Viral RNA Mini* siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA, USA).

#### 4.8. Preparación de cDNA viral.

La reacción de retrotranscripción (RT) empleando como molde RNA vírico se realizó utilizando el kit de RT-PCR *Accu-Script-PfuUltra II Fusion HS Kit* (Stratagene) tal y como indica el fabricante. La reacción consta de dos fases, una fase de desnaturalización (5 minutos a 65 °C) y otra de retrotranscripción (30 minutos a 42 °C) utilizando la enzima de alta fidelidad AccuScript High Fidelity RT.

#### 4.9. Amplificación del cDNA viral.

La reacción de amplificación (PCR) se realizó utilizando también el kit RT-PCR *Accu-Script-PfuUltra II Fusion HS Kit* (Stratagene) y el protocolo a seguir fue el indicado por el fabricante. Se utilizó la enzima Pfu Ultra II HS por su elevada fidelidad debido a su actividad correctora de errores (Airaksinen et al, 2003; Arias et al, 2001). Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo al siguiente esquema:



La temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos (55 °C) varió dependiendo de su temperatura de desnaturalización. Además, el tiempo de polimerización (establecido por defecto en 2 minutos) se ajustó a la longitud del fragmento que se amplificó en cada caso (la velocidad estimada de la polimerasa es de 1 Kb cada 30 segundos). Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y posterior tinción con bromuro de etidio o SYBR-SAFE (Invitrogen Molecular Probes). Se utilizó el marcador de peso molecular HindIII-digested Φ-29 DNA. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de RNA por RT-PCR se detallan en la Tabla 4.9.

**Tabla 4.9. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación y posterior secuenciación de cDNA víricos.**

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Posición <sup>a</sup>
Jc1-E1-F1	TCGCAGCCCAAATGTTTCATTG	1197-1217
Jc1-E2-F1	ACATGGGCCCCAGGCAGAAAATCC	1551-1574
Jc1-E2-R1	ACAGTACACTGGGCCACACAC	1850-1870
Jc1-E2-R2	TTGCATGCAGCCGTGAGCCTG	2266-2286
Jc1-p7-F1	TCTTAGCGGACGCCAGGGTTTGC	2526-2548
Jc1-p7-R1	AGACGCGTCATAAGCATAAGC	2771-2791
Jc1-NS5A F1	ACTCAGAAGACTCCACAATTGG	6220-6241
Jc1-NS5A F2	ACTACCTTCTCCAGAGTTTTTC	6697-6718
Jc1-NS5A R1	TGGGTGCAAACCTATGGATCTG	6737-6758
Jc1-NS5A F3	TTCCACGGGCCTTACCGGCTTG	7181-7203
Jc1-NS5B F1	TGGTCTACTTGCTCCGAGGAGG	7625-7646
Jc1-NS5A R3	ACTCAAAGGGTTGATTGGCAAC	7726-7747
Jc1-NS5B F2	CAAGAAACCAGCTCGCCTCATC	8125-8146
Jc1-NS5B R1	TCTCGCAGACCCGGACGCCGAG	8159-8180
Jc1-NS5B F4	AACCTCAACTTTGAGATGTATG	8990-9011
Jc1-NS5B R4	AGTTAGCTATGGAGTGTACCTAG	9454-9476
Jc1-NS5B R5	ACCTGGTCATGGCCTCCGTG	8682-8702
Jc1-NS5B F6	TGCCATACACTCGCTGACTGAGAG	8419-8442
Jc1-NS5B R3	TCTCAATTATGGCTGGAAGGTCC	9037-9059

<sup>a</sup>Numeración según JFH-I (número de acceso #AB047639)

#### 4.10. Purificación de fragmentos de DNA amplificados por PCR.

La purificación de los productos de PCR se realizó por filtración o mediante extracción a partir de gel de agarosa. Se purificó por filtración (kit *Microcon-PCR*, Merck-Millipore) cuando no se generaron bandas inespecíficas en el paso de RT-PCR. Para la purificación de una banda recortada a partir de un gel de agarosa se empleó el kit *Wizard SVGel and PCR Clean-Up System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA purificado se cuantificó en un espectrofotómetro de amplio espectro (Nanodrop 1000).

#### 4.11. Secuenciación de DNA.

La secuenciación de nucleótidos se efectuó mediante técnicas de secuenciación automática en el secuenciador 23 ABI 3730XLS (Applied Biosystems) por Macrogen. La reacción se realizó con el kit *Big Dye Terminator V3.1 Cycle sequencing kit* (Applied Biosystems). El análisis de las secuencias se llevó a cabo con el programa Seqman que forma

parte del paquete DNASTar (Lasergene 9.0 y 10.0) mediante la lectura de los cromatogramas. Cada secuencia se verificó con la lectura de dos reacciones independientes y de sentido contrario. Los oligonucleótidos empleados se detallan en la Tabla 4.9.

#### **4.12. Cuantificación de moléculas de RNA viral por amplificación mediante RT-PCR en tiempo real.**

La cuantificación de RNA vírico se realizó mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real con el aparato *LightCycler* (Roche) (Lindenbach, 2009). Se utilizó el kit *Light Cycler RNA Master SYBR Green I* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. La región genómica que se amplificó fue la zona no codificante 5'-UTR utilizando la pareja de oligonucleótidos HCV-5UTR-F2 (5'- TGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAG; orientación con sentido; el primer nucleótido localizado en el extremo 5' se corresponde con el residuo 57 del genoma de HCV) y HCV-5UTR-R2 (5'- TGCTCATGGTGCACGGTCTACGAG; orientación antisentido; el nucleótido situado en el extremo 5' se corresponde con el residuo genómico 347 de dicho genoma). El RNA de las muestras se cuantificó por extrapolación de los valores a los de una recta patrón que se obtuvo a partir de concentraciones conocidas de RNA de HCV (sintetizado por transcripción *in vitro* a partir del plásmido GNN). La especificidad de la reacción fue comprobada mediante análisis de la curva de fusión de los DNAs amplificados. Las curvas de fusión permiten distinguir entre productos de amplificación específica y productos artefactuales de bajo peso molecular (como dímeros de oligonucleótidos) ya que los productos específicos presentan una temperatura de fusión más alta. Para asegurar la ausencia de contaminación con moldes no deseados se llevaron en paralelo controles negativos (amplificación sin RNA molde y con RNA extraído a partir de células sin infectar) en cada una de las cuantificaciones por RT-PCR.

#### **4.13. Extinción del HCV.**

El criterio para considerar que existe extinción de HCV ha sido adaptado a partir del previamente descrito para FMDV (Perales et al, 2009a; Perales et al, 2009b). Se consideró que el virus se había extinguido cuando se cumplieron tres condiciones:

- 1) Ausencia de infectividad en el sobrenadante del pase que se considera extinguido.
- 2) Ausencia de amplificación de RNA mediante RT-PCR en ese mismo pase usando oligonucleótidos altamente sensibles (JcI-NS5A FI y JcI-NS5A RI de la Tabla 4.9).
- 3) Ausencia de infectividad después de tres pases en ciego (sin droga) del sobrenadante negativo a las dos condiciones anteriores.

Estos criterios se aplican porque una bajada de la infectividad (incluso por debajo del límite de detección) no implica necesariamente extinción de un virus (basado en distintas observaciones realizadas en nuestro laboratorio).

#### **4.14. Clonaje molecular para el análisis genético de poblaciones de HCV.**

Para asegurar que la amplificación del RNA viral por RT-PCR se produce a partir de una cantidad suficiente de RNA molde, se realizaron diluciones seriadas 1:10, 1:100 y 1:1000 de las muestras de RNA a analizar. Sólo cuando al menos la dilución 1:100 originó un producto de PCR positivo, la muestra sin diluir se empleó para el clonaje y análisis siguientes. Siempre se utilizaron enzimas de alta fidelidad en las reacciones de RT-PCR (apartado 4.9). Se analizaron distintas regiones codificantes del genoma del virus como E2, NS5A, NS4B-NS5A y NS5B. Los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones de las diferentes regiones se describen en la Tabla 4.9.

##### **4.14.1. Clonaje en pGEM-T/pGEM-T Easy y transformación de bacterias DH5 $\alpha$ .**

El análisis de cuasiespecies se realizó mediante la secuenciación de clones moleculares. Se clonaron los productos de RT-PCR procedentes de RNA virales en los vectores comerciales pGEM-T o pGEM-T Easy (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Estos vectores presentan extremos cohesivos por lo que el producto de PCR (apartado 4.9) se sometió a una reacción de incorporación de una A en cada extremo 3' (*tailing*). La reacción incluyó 5  $\mu$ l de producto de RT-PCR previamente purificado, 1  $\mu$ l de tampón para la enzima GoTaq (Promega), 0.6  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2  $\mu$ l de dATP (Invitrogen) y 1  $\mu$ l de GoTaq (Promega). La mezcla se incubó a 70 °C durante 40 minutos y se conservó a 4 °C hasta su uso en el clonaje.

El producto de la reacción de *tailing* se ligó al vector pGEM-T o pGEM-T Easy (Promega) usando la ligasa del fago T4. Se realizó en paralelo un control positivo de ligación que consistió en el clonaje de un DNA control proporcionado por la casa comercial.

Se transformaron células DH5 $\alpha$  competentes con los productos de ligación mediante choque térmico a 42 °C durante 30 segundos. Después, las células se crecieron en medio SOC (*Super optimal broth* con Glucosa) a 37 °C durante 60 minutos con agitación.

Posteriormente, se sembraron en placas de LB-Agar con el antibiótico ampicilina a 200 µg/ml, 50 µl de X-gal (20 mg/ml), 5 µl de IPTG (20%) y se dejaron crecer durante la noche a 37 °C. Se realizó en paralelo un control positivo de transformación utilizando el plásmido pGEM3zf+.

#### **4.14.2. Clonaje en pBluescript y transformación de bacterias DH10B.**

El análisis de cuasiespecies por secuenciación de clones moleculares también se realizó mediante el clonaje de los productos de RT-PCR en el vector pBluescript (Agilent) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este vector fue digerido con EcoRV antes de proceder al paso de ligación para el que se usó la ligasa del fago T4. Células DH10B competentes se transformaron con los productos de ligación mediante electroporación, en cubetas de 0,2 cm (Biorad) (25 µF, 2,5 kV, 100 Ω). Antes de la electroporación se eliminó el exceso de sales de las mezclas de ligación usando membranas de ósmosis (Millipore). Las células se crecieron en medio LB a 37 °C durante 45 minutos con agitación, y se sembraron en placas de LB-Agar con el antibiótico ampicilina a 200 µg/ml, 50 µl de X-gal (20 mg/ml), 5 µl de IPTG (20%) y se dejaron crecer durante la noche a 37 °C.

#### **4.14.3 Amplificación del DNA previamente clonado.**

Se seleccionaron colonias bacterianas con inserto (colonias blancas) y se sembraron (en forma de pequeña estría) en placas LB-Agar con el antibiótico ampicilina a 200 µg/ml, 50 µl de X-gal (20 mg/ml) y 5 µl de IPTG (20%). De este modo se amplificó el material biológico (colonia bacteriana) que contenía el inserto de interés.

Se utilizaron dos estrategias de amplificación del DNA de interés para su secuenciación:

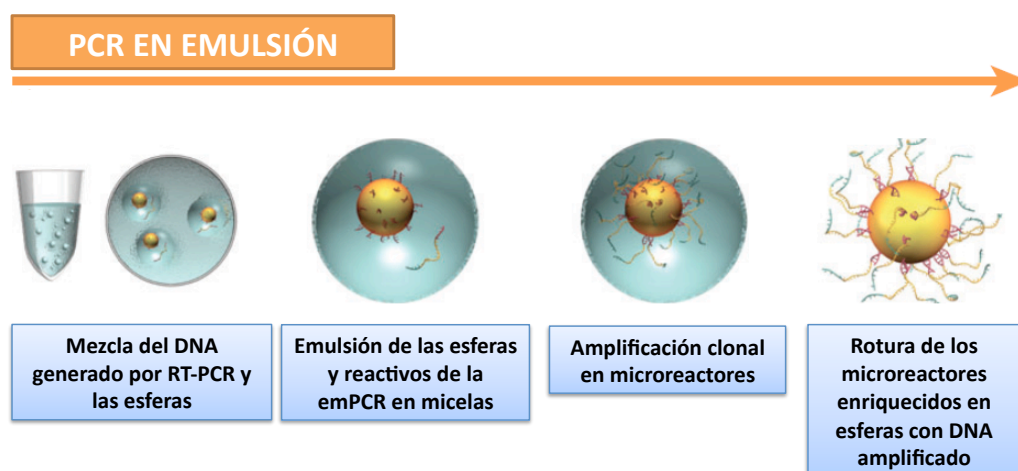
- 1) Las colonias se crecieron durante 24 horas en medio LB líquido en presencia de ampicilina (200 µg/ml) y el plásmido se purificó con el kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto purificado se cuantificó en el espectrofotómetro de amplio espectro (Nanodrop 1000) y una pequeña cantidad del producto se utilizó para la secuenciación (apartado 4.11).
- 2) Se amplificó el plásmido que contenía el inserto con el kit *Illustra TempliPhi DNA Sequencing Template Amplification* (code: 25-6400-01, GE Healthcare) siguiendo las

instrucciones del fabricante. El producto de la amplificación se utilizó para la secuenciación (apartado 4.11).

#### 4.15. Análisis por secuenciación masiva de poblaciones de HCV.

Para el análisis de cuasiespecies mediante secuenciación masiva se utilizó el secuenciador GS-FLX 454 Life Science-Roche (Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona). Las amplificaciones mediante RT-PCR a partir de RNA viral se realizaron usando el kit RT-PCR *Accu-Script-PfuUltra II Fusion HS Kit* (Stratagene) (apartados 4.8 y 4.9). Se analizó la región genómica correspondiente al gen NS5A (desde la posición 6681 a la 8278, que incluye las regiones ISDR y IRRDR). El secuenciador GS-FLX 454 Life Science-Roche permite secuenciar fragmentos de 300–500 nucleótidos por lo que se diseñaron oligonucleótidos específicos para dividir la región genómica en 6 amplicones solapantes (Tabla 4.15). Para minimizar los errores generados durante la amplificación del material genético, las RT-PCRs se realizaron por triplicado y se mezclaron equimolarmente entre sí. A continuación los productos generados por RT-PCR se purificaron (Ampure Beads), se cuantificaron (Ensayo de Pico Green) y se analizó su calidad (Bioanalyzer). Controles negativos (sin molde de RNA) se llevaron en paralelo para asegurar la ausencia de contaminación con moldes no deseados.

Los oligonucleótidos usados para la secuenciación masiva se denominan cebadores de fusión y permiten la unión de los fragmentos generados por RT-PCR a unas esferas de captura de DNA y su posterior amplificación clonal mediante una PCR en emulsión (emPCR) de forma que a cada esfera se une solamente una molécula de DNA. En cada placa de secuenciación masiva se encuentran en torno a 150.000 esferas y cada una de ellas nos dará una secuencia distinta, correspondiente a un clon de la población (Fig. 4.15).



**Figura 4.15. Pasos secuenciales de la PCR en emulsión (emPCR).** (Adaptado de la web de Roche).



Los fragmentos de DNA unidos a las microesferas se depositan en las placas correspondientes compuestas por miles de celdillas independientes donde tiene lugar la secuenciación en paralelo de cada molde de DNA. La incorporación secuencial de nucleótidos por la polimerasa genera señales de luz que se recogen en una cámara CCD.

El análisis de datos se realizó a partir de los archivos fasta obtenidos por el software 454 GS tras controles que garantizan la calidad e integridad de los amplicones. A continuación, se asignó cada secuencia a una muestra y a un amplicón en particular. Se estableció un nuevo filtro de calidad de las secuencias y solo se tuvieron en cuenta haplotipos representados en al menos el 0,25% de las lecturas (Ramirez et al, 2013). Se alcanzaron las mismas conclusiones cuando el corte se hizo en el 1,0% de las lecturas. El procesamiento de los datos se realizó utilizando los programas R (Team, 2012), Bioconductor (Gentleman et al, 2004) y la librería Biostrings (Pages et al, 2012), que permitieron analizar estadísticamente, emparejar patrones y alinear las secuencias.

**Tabla 4.15. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación y posterior secuenciación de RNA víricos mediante secuenciación masiva.**

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Posición <sup>a</sup>
<b>NS5A-T1F<sup>b</sup></b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA <b>TCAG</b> <u>AAACCACGTCGCCCCTACTCAC</u>	6130-6151
<b>NS5A-T1R<sup>b</sup></b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC <b>TCAG</b> <u>AGGCGGACATTGCCAGAGAT</u>	6455-6474
<b>NS5A-T2F<sup>b</sup></b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA <b>TCAG</b> <u>TGACCACGCGCTGCCCTTGC</u>	6426-6445
<b>NS5A-T2R<sup>b</sup></b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC <b>TCAG</b> <u>AGACCTCATCCCGGAAAAACG</u>	6768-6788
<b>NS5A-T3F<sup>b</sup></b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA <b>TCAG</b> <u>TTCTCCTGGGTGGACGGTGTG</u>	6716-6736
<b>NS5A-T3R<sup>b</sup></b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC <b>TCAG</b> <u>TGCTGATAGCTGGCTCACTGAG</u>	6955-6976
<b>NS5A-T4F<sup>b</sup></b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA <b>TCAG</b> <u>ACATCACGGCGGAGACTGC</u>	6891-6909
<b>NS5A-T4R<sup>b</sup></b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC <b>TCAG</b> <u>AACGGTGGGCGGTTGGTAATC</u>	7253-7273
<b>NS5A-T5F<sup>b</sup></b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA <b>TCAG</b> <u>TGGGCACGGCCTGACTACAACC</u>	7202-7223
<b>NS5A-T5R<sup>b</sup></b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC <b>TCAG</b> <u>AAGCTCTACCTGATCAGACTCCA</u>	7551-7573
<b>NS5A-T6F<sup>b</sup></b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA <b>TCAG</b> <u>AGCGGTGATGCAGGCTCGTC</u>	7412-7431
<b>NS5A-T6R<sup>b</sup></b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC <b>TCAG</b> <u>ACTCAAAGGGTTGATTGGCAAC</u>	7726-7747

<sup>a</sup>Numeración según JFH-I (número de acceso #AB047639).

<sup>b</sup>Los 4 nucleótidos en rojo son la secuencia "llave" a partir de la cual se encuentran los nucleótidos que se corresponden con la secuencia de HCV (subrayados). Los nucleótidos en el extremos 5' son los adaptadores, estos proporcionan las secuencias de hibridación a las esferas y sirven para la posterior amplificación y secuenciación de los fragmentos de la RT-PCR.

#### 4.16. Cálculo de frecuencias de mutación mínima y máxima, diversidad nucleotídica y entropía de Shannon normalizada.

El efecto mutagénico de una droga para un virus se cuantifica mediante parámetros derivados de la comparación de secuencias encontradas en los espectros de mutantes, que reflejan la complejidad de la población. La frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones distintas (incluyendo transiciones, transversiones, deleciones e inserciones y

contando las repetidas una sola vez) dividido por el número de nucleótidos secuenciados. La frecuencia de mutación máxima es el número total de mutaciones encontradas (independientemente de que estén repetidas) dividido por el número de nucleótidos secuenciados. Los haplotipos son el número de secuencias distintas dentro de una población.

Para cuantificar la diversidad de las secuencias genómicas de una población se utilizaron dos parámetros, la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y la entropía de Shannon normalizada ( $S_n$ ).

La diversidad nucleotídica es la media de nucleótidos distintos por posición entre pares de secuencias del mismo espectro de mutantes y de la misma región genómica. Se calculó según la fórmula:

$$\pi = n(n-1)/2 \sum_{ij} \pi_{ij} (i < j)$$

en la que “n” es el número de clones, y “ $\pi_{ij}$ ” es el número de nucleótidos distintos entre un par de secuencias “ij” dividido por la longitud de la secuencia en nucleótidos (Nei & Li, 1979). Los intervalos de confianza para la diversidad nucleotídica se calcularon usando el método de remuestreo bootstrap.

La entropía de Shannon normalizada ( $S_n$ ) es una medida de la similitud existente entre los diferentes genomas que constituyen un espectro de mutantes, tomando valores comprendidos entre 0 (homogeneidad completa) y 1 (heterogeneidad completa). La justificación teórica de este concepto se describe en (Volkenstein, 1994) y una aplicación al estudio de las cuasiespecies virales puede encontrarse en (Airaksinen et al, 2003; Pariente et al, 2003; Ruiz-Jarabo et al, 2000; Sierra et al, 2007; Sierra et al, 2000). La entropía de Shannon normalizada ( $S_n$ ) se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$S_n = -[\sum_i (p_i \cdot \ln p_i)] / \ln N$$

en la que “ $p_i$ ” es la frecuencia de cada secuencia en el conjunto de secuencias estudiado y “N” el número total de secuencias analizadas.

#### **4.17. Análisis de niveles de nucleótidos intracelulares.**

Los protocolos usados se han descrito previamente (Pogolotti & Santi, 1982; Sanchez-Jimenez et al, 2012). Células Huh-7.5 reporter ( $2 \times 10^6$  células) sin tratar o tratadas con los compuestos que se indicaron en los distintos experimentos se lavaron con PBS y se incubaron en hielo durante 10 minutos con 900  $\mu$ l de 0.6 M de ácido tricloroacético. Una

mezcla enfriada previamente de 720  $\mu$ l de Uvasol® (1,1,2-triclorotrifluoroetano, Sigma) y 180  $\mu$ l de Tri-n-octilamina (Sigma) se mezcló con los 900  $\mu$ l del sobrenadante, se agitó en el vortex durante 10 segundos y se centrifugó durante 30 segundos a 12,000 g y 4 °C. Las muestras se conservaron a -80 °C hasta el momento del análisis. Los nucleótidos se separaron en una columna analítica Partisil 10 SAX (4.6×250 mm) (Whatman) con una precolumna Partisil 10 SAX (4.6×30 mm) (Capital HPLC). Cada muestra (100  $\mu$ l) se inyectó en un sistema de HPLC Alliance 2695 conectado a un detector de matriz de fotodiodos 2996 (Waters). La tasa de flujo de elución fue de 0,8 ml/min, y los nucleótidos fueron detectados a una longitud de onda de 254 nm, a excepción de la RTP que fue detectada a 220 nm. Antes de la inyección de las muestras, la columna se equilibró con 60 ml de 7 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , pH 3.8 (tampón A). El programa para la separación comenzó con 22 minutos de un periodo isocrático (periodo en el que se utiliza un solo solvente) con tampón A seguido de un gradiente lineal de 112 minutos hasta alcanzar una concentración de 250 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 500 mM KCl y pH 4.5 (tampón B). Finalmente se acabó con otro periodo isocrático de 37 minutos de tampón B. Como control de separación y cuantificación se inyectaron 50  $\mu$ l de 20 pmol/ $\mu$ l UTP, CTP, ATP, GTP, UDP, CDP, ADP y GDP; y 80 pmol/ $\mu$ l de RTP (Jena Bioscience). Para el análisis se utilizó el software Waters Empower™ Chromatography Data Software. Las determinaciones se llevaron a cabo en dos réplicas biológicas independientes y cada una de ellas se midió por triplicado. La cantidad de cada nucleótido en los extractos celulares se normalizó relativo al número de células que había en la placa según el tratamiento y el tiempo. Los análisis se realizaron en la Universidad de Málaga, con la colaboración de la Dra. Ana Grande-Pérez.

## **4.18. Ensayos bioquímicos con la polimerasa NS5B.**

### **4.18.1 Expresión y purificación de la proteína NS5B.**

Las secuencias codificantes de dos polimerasas NS5B de HCV de genotipos 1b (Con1) y 2a (JFH-1) se clonaron en el vector de expresión pET21b (Novagen). Se excluyó la región hidrofóbica del extremo C-terminal de la proteína ( $\Delta$ 21) y se agregó una cola de histidinas en esa región. La expresión de proteínas se realizó en *Escherichia coli* BL21 (DE3). Los cultivos se crecieron en medio LB con ampicilina (100 mg/ml) hasta alcanzar una densidad óptica (595 nm) de 0,6-0,7. En ese momento (fase exponencial), se añadió IPTG (Fermentas) a una concentración final de 0,25 mM. Los cultivos se crecieron entonces durante 12 horas a 25 °C y posteriormente las células se centrifugaron a 3.700 r.p.m. durante 30 minutos obteniéndose un sedimento que se congeló a -80 °C (Powdrill et al, 2011). El sedimento de bacterias se resuspendió en 500 ml de tampón de resuspensión

(Hepes pH 7,2, glicerol al 10%, NaCl 500 mM, NP40 al 0,02%) y se incubó durante 30 minutos a 4 °C con agitación en presencia de 0,1 mg/ml lisozima (Sigma) y 1 mM fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF, Boehringer). A continuación, la suspensión se lisó alternando 3 ciclos de sonicación de 15 segundos con 3 ciclos de 15 segundos en hielo y la fracción soluble se recuperó mediante una centrifugación a 12.000 r.p.m de 40 minutos. La polimerasa se purificó mediante cromatografía de afinidad en columna de níquel. Para ello, la muestra se pasó a través de la columna de níquel previamente equilibrada con el tampón de resuspensión. La proteína unida se lavó con este tampón y se eluyó con un gradiente de imidazol (entre 100 y 500 mM) en tampón de resuspensión. Las fracciones con proteínas se detectaron mediante el ensayo Bradford, se juntaron y dializaron a 4 °C durante 12-14 horas frente al tampón de diálisis (Tris 10 mM, Glicerol al 50%, NaCl 600 mM y DTT 5 mM). Las fracciones con proteína purificada se distribuyeron en alícuotas y se congelaron a -80 °C. La concentración de proteína se determinó mediante el valor de la absorbancia.

#### **4.18.2 Marcaje en 5' del dinucleótido GG.**

Los dinucleótidos GG fueron marcados en el extremo 5' con [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP (Amersham) mediante la polinucleótido kinasa de T4 (New England Biolabs) durante 1 hora a 37 °C. La polinucleótido kinasa fue inactivada por calor (10 minutos a 70 °C).

#### **4.18.3. Ensayo de elongación.**

Antes de evaluar la eficiencia de incorporación de distintos nucleótidos o RTP sobre un molde de RNA (Tabla 4.18) se realizaron ensayos de actividad enzimática empleando el dinucleótido marcado GG\* como cebador. Estos ensayos nos permitieron conocer la cantidad de enzima activa tras la purificación. La mezcla de la reacción (GG\* 200 nM, oligonucleótido molde 500 nM, EDTA 0,5 nM, NaCl 15 mM, NTPs 5  $\mu\text{M}$  y enzima 1  $\mu\text{M}$ ) se preincubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, para permitir la formación del complejo NS5B-RNA. Tras la preincubación, la reacción se inició mediante la adición de  $\text{MgCl}_2$  y se paró por adición de una solución de parada [95% (v/v) de formamida desionizada, 0,025% (p/v) de azul de bromofenol y 0,025% (p/v) de violeta de bromofenol].

Para evaluar la eficiencia de incorporación de distintos nucleótidos o RTP se realizaron ensayos de elongación de un molde de RNA usando el dinucleótido marcado GG\* como cebador, en ensayos de tipo dosis-respuesta. La mezcla de la reacción (GG\* 200 nM, oligonucleótido molde 500 nM, EDTA 0,5 nM, NaCl 15 mM, NTPs para elongar hasta la posición de interés a 5  $\mu\text{M}$  y enzima 1  $\mu\text{M}$ ) se preincubó a temperatura ambiente durante 10

minutos y se inició mediante la adición de  $MgCl_2$  prolongándose durante 40 minutos. A continuación, se añadió el nucleótido para el que se midió la eficiencia de incorporación en un rango de concentraciones y finalmente se paró la reacción por adición de la solución de parada (descrita anteriormente).

Se utilizó ATP, UTP, CTP y GTP de Amersham; y RTP de Jena Bioscience. Para analizar los productos de la reacción, las mezclas con el tampón de parada se calentaron a 100 °C durante 5-10 minutos y se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20% con 7M de urea en TBE (100 W durante 3 horas). Los geles con los productos de la reacción resueltos fueron expuestos a placas fotosensibles y densitometrados.

Los procedimientos descritos en el apartado 4.18 se realizaron en el laboratorio del Dr. Matthias Götte durante una estancia corta en la Universidad de McGill (Montreal, Canadá).

**Tabla 4.18. Moldes utilizados para los ensayos bioquímicos con la polimerasa de HCV.**

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3') <sup>a</sup>
T20C16	AACA <u>G</u> UUUCCUUUUCUCUCC
T20G16	AAAU <u>C</u> GAGAAGGAGAAAGCC

<sup>a</sup> El nucleótido de color rojo es la posición que permitirá medir la eficiencia de incorporación del NTP o RTP a estudio.

## 4.19. Análisis estadísticos.

La significación estadística de las diferencias existentes entre frecuencias de mutación, inserción o delección o entre repertorios de tipos de mutaciones se evaluó usando el test chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). La significación de diferencias en diversidad nucleotídica asociada con tratamiento a drogas se obtuvo mediante tests de permutación con 10.000 permutaciones por prueba, empleando el programa MATLAB® (Ortega-Prieto et al, 2013). La significación estadística de diferencias en producción de progenie viral causadas por tratamientos con agentes antivirales y de diferencias en la infectividad específica, se realizó mediante análisis unidireccional o bidireccional de la varianza, según el experimento, con el paquete estadístico SPSS 13.0 (SPSS, Inc.) (para comparaciones múltiples se aplicó la corrección de Bonferroni) o un t-test, empleando la hoja de cálculo Excel (Microsoft Office).

## 4.20. Disoluciones y tampones utilizados.

- Tripsina-EDTA: 0,5 mg/ml tripsina (Sigma), etilendiaminotetracetato sódico (EDTA; Merck) al 0,016% y rojo fenol al 0,001% diluidos en PBS.

- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6,8.
- PBS-Tween: Tween-20 al 0,1% diluido en PBS.
- TBS: 150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0.
- TBS-Tween: Tween-20 al 0,1% diluido en TBS.
- Tampón de bloqueo de inmunotinción: Albumina de suero bovino (BSA) al 1% y leche desnatada en polvo al 0,2% diluidos en PBS.
- DAB 1%: 1g de DAB (3,3'-diaminobenzidina, Sigma o DAB-tetraclorhidrato), 100 ml de agua destilada y 500 µl de HCl a una concentración de 10N.
- Suero de caballo 2,5%: 1,25 ml de suero de caballo (Sigma H1270), 0,4 ml de acida sódica al 10% y 48,35 ml de PBS.
- Solución de X-Gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido (Roche) al 2% en dimetilformamida (Merck).
- Solución de IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosido en agua destilada.
- TAE: 40 mM Tris acetato, pH 8,3, 1 mM EDTA.
- TBE: 90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA.
- TE: 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0.
- Tampón de ruptura (extracción de proteínas): 160 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 M DTT, 2% SDS, glicerol al 11% , azul de bromofenol al 0,033% .
- Tampón de electroforesis para Western blot: 25 mM Tris-HCl, 190 mM glicina y SDS al 0,1% , pH 8,3.
- Tampón de transferencia para Western blot: 25 mM Tris-HCl, 190 mM glicina, metanol al 20% y SDS al 0,1%, pH 8,3.

## 5. Resultados

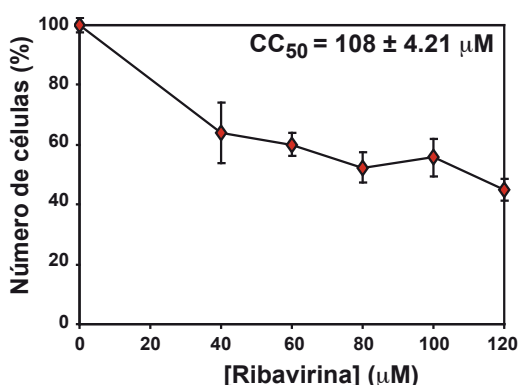
### 5.1. Extinción del virus de la hepatitis C por ribavirina en células de hepatoma humano.

Algunos estudios realizados en cultivos celulares sugieren que R posee una actividad mutagénica para HCV (Brochot et al, 2007; Contreras et al, 2002; Hofmann et al, 2007; Kanda et al, 2004; Pfeiffer & Kirkegaard, 2005b; Zhou et al, 2003). Sin embargo otros trabajos no obtienen el mismo resultado (Chevaliez et al, 2007; Kato et al, 2005; Mori et al, 2011). Conocer el mecanismo por el cual R ejerce un efecto antiviral sobre HCV es muy relevante ya que puede influir en el diseño de protocolos antivirales (Perales et al, 2012).

En este apartado se estudia el efecto de varios fármacos o sus combinaciones sobre HCV a lo largo de pases seriados en cultivos celulares.

#### 5.1.1. Concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) de ribavirina para células Huh-7.5 reporter.

Para conocer el efecto citotóxico de la R se determinó la concentración que reduce la viabilidad celular al 50% (CC<sub>50</sub>). Para ello células Huh-7.5 reporter se incubaron con concentraciones crecientes de R (de 0 a 120  $\mu$ M) y se determinó la viabilidad de las células 72 horas después del tratamiento. R resultó ser moderadamente tóxica para las células, con CC<sub>50</sub> =  $108 \pm 4,2 \mu$ M (Fig. 5.1.1).

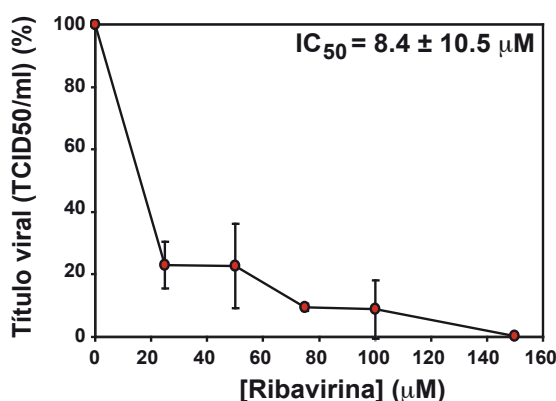


**Figura 5.1.1. Cuantificación de la toxicidad para las células Huh-7.5 reporter de la ribavirina.** La determinación de la concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) se llevó a cabo por triplicado y se representan los valores de las desviaciones estándar. Las condiciones experimentales se describen en el apartado 4.4 de Materiales y Métodos.

### 5.1.2. Concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de ribavirina para el virus de la hepatitis C.

Para cuantificar la inhibición de la producción de progenie infecciosa de HCV (IC<sub>50</sub>) se infectaron células Huh-7.5 reporter con HCVp0 a una MOI de 0,2-0,5 TCID<sub>50</sub>/célula en presencia de concentraciones crecientes de R y se midió la producción de progenie infecciosa.

El valor de IC<sub>50</sub> para R se muestra en la Fig. 5.1.2. A partir de los datos de CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> (Figs. 5.1.1 y 5.1.2) se calculó el índice terapéutico (TI = CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>) para R, obteniéndose un valor de TI de 12,8. Este valor indica una eficacia aceptable y sirvió como referencia para la elección de la concentración de R en los siguientes experimentos.



**Figura 5.1.2. Cuantificación de la inhibición de la producción de progenie infecciosa de HCV por ribavirina.** La determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) se llevó a cabo por triplicado y se representan los valores de las desviaciones estándar. Las condiciones experimentales se describen en los apartados 4.5 y 4.6 de Materiales y Métodos.

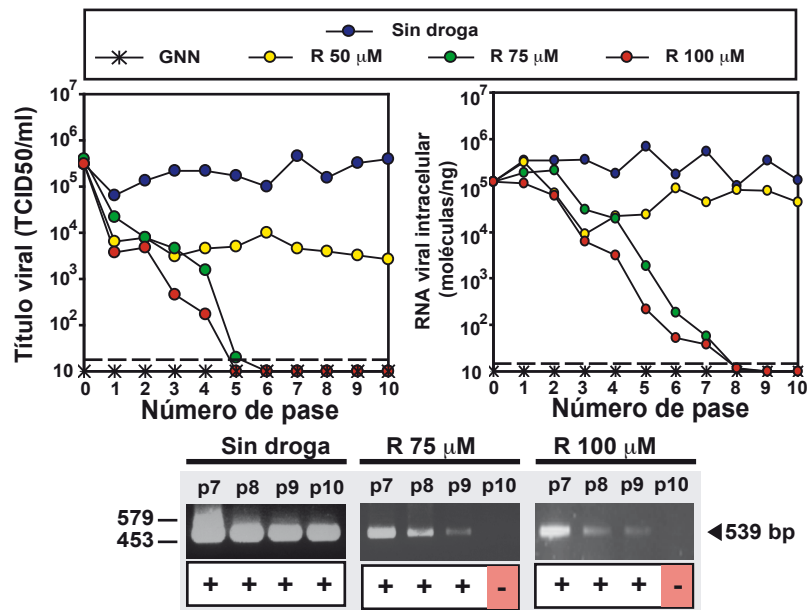
### 5.1.3. Influencia de las condiciones experimentales sobre la replicación del virus de la hepatitis C durante el tratamiento con ribavirina.

El virus HCVp0 fue sometido a 10 pases seriados en células Huh-7.5 reporter usando una MOI inicial alta (1-2 TCID<sub>50</sub>/célula) o baja (0.1-0.2 TCID<sub>50</sub>/célula) en ausencia o presencia de distintas concentraciones de R. Los resultados muestran una bajada de la producción de progenie viral infecciosa y de RNA intracelular de HCV como resultado del tratamiento con R (Fig. 5.1.3.1 y 5.1.3.2). Una excepción fue la replicación disminuida pero continuada de HCV en presencia de R 50 μM en la infección a alta MOI inicial. En el resto de casos, la infectividad y el RNA viral intracelular disminuyeron a niveles por debajo del límite de detección entre los pases 3 y 9 (Fig. 5.1.3.1 y 5.1.3.2). El descenso de la infectividad en los sobrenadantes de las infecciones precedió al descenso de RNA viral intracelular.

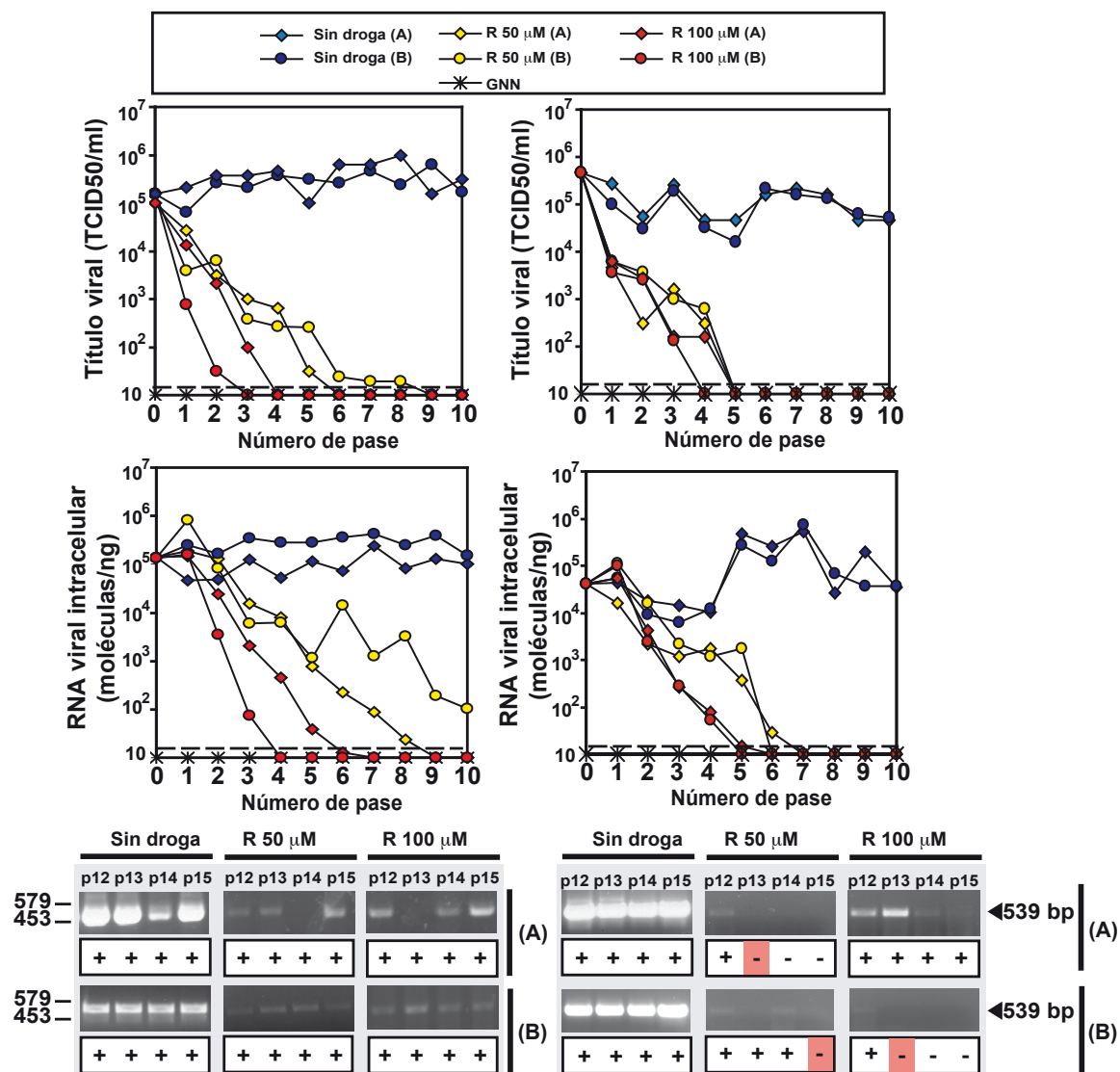
Estudios anteriores sobre mutagénesis letal en nuestro laboratorio definieron un triple criterio para considerar la existencia de extinción viral: primero, ausencia de infectividad después de tres pases en ciego del sobrenadante en ausencia de droga y segundo, ausencia de



material amplificable por RT-PCR usando un protocolo muy sensible de amplificación (Agudo et al, 2010; Pariente et al, 2001; Sierra et al, 2000). Cuando se aplicaron a estos ensayos, no se rescató infectividad de las poblaciones de HCV tratadas con R que fueron sometidas a los 3 pases en ciego. Sin embargo, algunas infecciones, a pesar de no presentar infectividad, generaron una banda de amplificación específica de HCV incluso hasta después de 15 pases (Fig. 5.1.3.2). Este es un punto interesante que será tratado en el apartado 6.1 de Discusión.



**Figura 5.1.3.1. Efecto de la ribavirina sobre la producción de progenie infecciosa y RNA viral intracelular en infecciones de HCV a una MOI inicial alta.** Se infectaron células Huh-7.5 reporter con HCVp0 a una MOI de 1-2 TCID<sub>50</sub>/célula, en ausencia o presencia de ribavirina a las concentraciones indicadas en el cuadro superior. Se llevaron a cabo infecciones con HCV GNN en paralelo (control negativo). Se usó la progenie de cada infección para infectar células en el siguiente pase del virus (apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos). Se determinó la infectividad viral en el sobrenadante de los cultivos celulares (panel de la izquierda), y se midió el RNA viral intracelular por RT-PCR cuantitativa (panel de la derecha). La línea discontinua paralela al eje de abscisas indica el límite de detección de la infectividad y del RNA viral intracelular (apartados 4.6.3 y 4.12 de Materiales y Métodos). En el cuadro inferior se muestran las bandas de amplificación de 539 pb generadas por una RT-PCR altamente sensible en la que se usa como molde RNA viral intracelular de los pases indicados; los signos + y - indican presencia o ausencia de banda de amplificación (apartado 4.13 de Materiales y Métodos).



**Figura 5.1.3.2. Efecto de la ribavirina sobre la producción de progenie infecciosa y RNA viral intracelular en infecciones de HCV a una MOI inicial baja.** Se infectaron células Huh-7.5 reporter con HCVp0 a una MOI de 0,1-0,2 TCID<sub>50</sub>/célula usando dos protocolos diferentes. En el primero se infectaron 4x10<sup>6</sup> células Huh-7.5 reporter con 4x10<sup>5</sup> - 8x10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> de HCVp0 (paneles de la izquierda) y en el segundo se infectaron 4x10<sup>5</sup> células Huh-7.5 reporter con 4x10<sup>4</sup> - 8x10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> de HCVp0 (paneles de la derecha). Se realizaron 2 réplicas biológicas por concentración, nombradas A y B, como se indica en el cuadro superior. Además, se llevaron a cabo infecciones con HCV GNN en paralelo (control negativo). Se usó la progenie de cada infección para infectar células, en un nuevo pase (apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos). Se determinó la infectividad en el sobrenadante de los cultivos celulares (paneles superiores), y se midió el RNA viral intracelular por RT-PCR cuantitativa (paneles inferiores) (apartados 4.6.3 y 4.12 de Materiales y Métodos). La línea discontinua paralela al eje de abscisas indica el límite de detección de la infectividad y del RNA viral intracelular. En el cuadro inferior se muestran las bandas de amplificación de 539 pb generadas por una RT-PCR altamente sensible en la que se usa como molde RNA viral intracelular de los pases indicados; los signos + y - indican presencia o ausencia de banda de amplificación (apartado 4.13 de Materiales y Métodos).

#### 5.1.4. Complejidad del espectro de mutantes en poblaciones del virus de la hepatitis C en ausencia o presencia de ribavirina.

Para determinar si el descenso de infectividad producido por R, y que antecedió al descenso de RNA viral intracelular de HCV, estaba asociado a una actividad mutagénica de la droga, se comparó la complejidad de los espectros de mutantes de poblaciones pasadas en presencia y ausencia de R (Fig 5.1.3.2). Estas poblaciones se originaron a partir de los pases de virus a una baja MOI inicial, descritos en el apartado 5.1.3. Para el análisis se escogieron las regiones genómicas E2, NS5A y NS5B, que codifican tanto proteínas estructurales como no estructurales y muestran diferentes grados de conservación (Tabla 5.1.4.1.).

Las regiones genómicas NS5A y NS5B de las poblaciones sometidas a tres pases en presencia de R experimentaron un aumento significativo de la frecuencia de mutación mínima (de 1,4 a 3,0 veces con R 50  $\mu$ M, y de 1,6 a 4,8 veces con R 100  $\mu$ M) respecto a la población pasada en ausencia de R ( $p < 0.05$  y  $p < 0.0005$ , respectivamente; test  $\chi^2$ ). Se observaron también aumentos estadísticamente significativos de la diversidad nucleotídica para poblaciones tratadas con R (NS5A  $p < 0.004$ ; NS5B  $p < 0.04$  y  $p < 0.005$ , respectivamente; test de permutación). Los incrementos en frecuencia de mutación mínima y diversidad nucleotídica de la región E2 no resultaron ser estadísticamente significativos, aunque existe una tendencia clara de aumento de ambos parámetros respecto a la población pasada en ausencia de la droga (Tabla 5.1.4.1.).

**Tabla 5.1.4.1. Análisis de las cuasiespecies de las poblaciones de HCVp0 pasadas en ausencia o presencia de ribavirina<sup>a</sup>.**

Región genómica <sup>b</sup>	[Ribavirina] ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	Nº de nt analizados (clones/haplotipos) <sup>c</sup>	Frecuencia de mutación <sup>d</sup>	Diversidad nucleotídica <sup>e</sup> $\pi \cdot 10^3$ (95 % IC)
<b>E2</b> (1490-2590)	0	15,122 (15/9)	$9,3 \times 10^{-4}$	1,11 (0,73-1,58)
	50	18,860 (17/14)	$1,3 \times 10^{-3}$	1,49 (1,15-2,01)
	100	20,657 (21/16)	$1,5 \times 10^{-3}$	1,74 (1,33-2,51)
<b>NS5A</b> (6269-7666)	0	29,704 (22/18)	$7,7 \times 10^{-4}$	1,16 (0,93-1,51)
	50	23,766 (17/17)	$1,4 \times 10^{-3}$	1,54 (1,16-2,11)
	100	21,396 (20/20)	$2,1 \times 10^{-3}$	2,43 (1,99-3,44)
<b>NS5B</b> (7667-8442/8443-9442)	0	22,691 (18, 10/5, 3)	$2,5 \times 10^{-4}$	0,74 (0,53-1,03) / 0,23 (0,11-0,56)
	50	37,862 (24, 22/17, 9)	$7,6 \times 10^{-4}$	1,60 (1,22-2,10) / 0,50 (0,26-0,87)
	100	16,676 (12, 11/7, 8)	$1,2 \times 10^{-3}$	1,25 (0,79-1,79) / 1,39 (0,74-2,30)

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas se corresponden con el pase 3 de infecciones descritas en la Figura 5.1.3.2.

<sup>b</sup> La numeración de los residuos del genoma de HCV se corresponde con la del genoma JFH-1 (número de acceso #AB047639). La región codificante NS5B se analizó a partir de dos amplificaciones distintas y solapantes entre sí.

<sup>c</sup> El paréntesis indica el número de clones analizados y de haplotipos encontrados (número de secuencias distintas de RNA en la población). Algunos clones analizados no se secuenciaron completamente.

<sup>d</sup> La frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones distintas encontradas dividido por el número total de nucleótidos secuenciados para cada población (apartado 4.16 de Materiales y Métodos).

<sup>e</sup> El cálculo de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y el intervalo de confianza (IC) se explican en el apartado 4.16 de Materiales y Métodos.

En estudios anteriores se ha descrito que R induce de forma preferencial transiciones G→A y C→U en HCV y otros virus RNA (Agudo et al, 2010; Airaksinen et al, 2003; Crotty et al, 2000; Dietz et al, 2013). El porcentaje de transiciones relativo al número total de mutaciones observados en las 3 regiones genómicas no varió como resultado del tratamiento con R (79.1%, 75,6% y 79.4% en ausencia y presencia de R 50 y R 100 μM, respectivamente). Sin embargo, el porcentaje de transiciones correspondiente a la suma de [(G→A)+(C→U)] aumentó del 32.5% en ausencia de R al 51.7% y 57.7% en presencia de R 50 y R 100 μM, respectivamente. Aunque estos incrementos no resultaron ser estadísticamente significativos (p=0,18 y p=0,1, respectivamente; test  $\chi^2$ ), se observó un aumento de la relación [(G→A)+(C→U)]/[(A→G)+(U→C)] (Fig. 5.1.4.1) que refuerza la conclusión de que R actúa como mutágeno para HCV.

	Sin droga				R 50 μM				R 100 μM			
	U	C	G	A	U	C	G	A	U	C	G	A
U		7	3	1		8	3	1		11	2	2
C	8		0	0	33		1	4	33		1	4
G	0	0		6	5	2		13	4	2		23
A	5	0	13		0	4	12		3	2	9	
$\frac{[(G \rightarrow A) + (C \rightarrow U)]}{[(A \rightarrow G) + (U \rightarrow C)]}$				0.70	2.25				2.67			

**Figura 5.1.4.1. Matrices de tipos de mutaciones en el espectro de mutantes de poblaciones de HCV que han sido pasadas en ausencia o presencia de ribavirina a baja MOI.** Las mutaciones (de los nucleótidos escritos verticalmente a los escritos horizontalmente) se contabilizan en los clones individuales analizados en cada población respecto a su secuencia consenso (que no varía respecto a la del aislado JFH-1). Se representan en rojo las transiciones que aumentan como consecuencia del tratamiento con R. La relación [(G→A)+(C→U)]/[(A→G)+(U→C)] está indicada en el recuadro debajo de cada matriz. Las poblaciones analizadas son las del pase 3 de las infecciones descritas en la Figura 5.1.3.2. La población tratada con R 50 μM presentó además una delección de dos nucleótidos localizada en las posiciones 1788 y 1789.

Las mutaciones observadas, las sustituciones de aminoácido y su probabilidad según la matriz de sustitución PAM 250 (Feng & Doolittle, 1996) se enumeran en las Tablas 5.1.4.2, 5.1.4.3 y 5.1.4.4. De ellas cabe destacar un incremento del porcentaje de mutaciones sinónimas respecto a no sinónimas causadas por la R, contrariamente a lo que cabría esperar. Las mutaciones se localizan de forma homogénea a lo largo de las tres regiones genómicas, no observándose ningún *hotspot* mutacional.

**Tabla 5.1.4.2. Mutaciones, cambio de aminoácido y su probabilidad (PAM 250) en los espectros de mutantes del gen E2 de HCVp3 pasado en ausencia o presencia de ribavirina (R)<sup>a</sup>.**

HCV p3 Sin droga			HCV p3 R 50 µM			HCV p3 R 100 µM		
Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250
A1493U	T2S	1	C1532U	R15C	-4	C1490U	R1F	-4
A1583G	N32D	2	C1579G	-	-	C1491U	R1F	-4
C1654U	-	-	A1583G	N32D	2	U1554C	M22T	-1
U1658C	S57P	1	A1590G	N34S	1	C1636A	-	-
C1954U	-	-	C1624U	-	-	C1648U	-	-
A1960U	I157F	1	C1654U	-	-	U1651C	-	-
G1987A	-	-	A1670C	T61P	0	C1654U	-	-
U2020C	W177R	2	C1671U	T61I	0	A1670U	T61S	1
A2167G	K226E	0	Del 1788-1789	- 2 nt	-	C1672U	-	-
U2203C	-	-	G1987A	-	-	U1679C	F64L	2
C2320U	-	-	C2053U	-	-	G1765A	-	-
U2341C	S284P	1	G2193A	R235K	3	G1892A	V135M	2
C2401U	-	-	C2195U	L236F	2	G1909A	-	-
U2568G	I360S	-1	C2212U	-	-	G1963A	-	-
			C2230U	-	-	U1972A	-	-
			C2284U	-	-	G1987A	-	-
			A2321C	-	-	A2054C	R189S	0
			G2328A	R280K	3	G2112U	R208M	0
			U2374C	-	-	C2135U	L216F	2
			G2393A	D302N	2	C2143U	-	-
			C2401U	-	-	C2146U	-	-
			C2422A	-	-	G2307A	C273Y	0
			C2455U	-	-	A2321C	-	-
			G2533A	-	-	A2372G	I295V	4
			C2550U	A354V	0	U2374C	-	-
						A2460G	Y324C	0
						A2482G	-	-
						G2531A	A348T	1
						C2548U	-	-
						C2569U	-	-
						G2585A	E366K	0
<b>Mutaciones distintas</b>	<b>14</b>		<b>Mutaciones distintas</b>	<b>25</b>		<b>Mutaciones distintas</b>	<b>31</b>	
<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>6 (43)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>14 (58)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>17 (55)</b>	
<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>8 (57)</b>		<b>No sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>10 (42)</b>		<b>No sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>14 (45)</b>	
<b>Deleciones</b>	<b>0</b>		<b>Deleciones</b>	<b>1</b>		<b>Deleciones</b>	<b>0</b>	

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas son las del pase 3 de las infecciones descritas en la Figura 5.1.3.2.

<sup>b</sup> La numeración de los residuos del genoma de HCV se corresponde con la del genoma JFH-1 (número de acceso #AB047639). Los aminoácidos se representan según el código de una letra (explicado en Abreviaturas) y se numeran desde el aminoácido N-terminal al C-terminal.

<sup>c</sup> Número de mutaciones sinónimas y no sinónimas, y el porcentaje de cada una de ellas. El porcentaje de mutaciones sinónimas y no sinónimas se calculó sin tener en cuenta deleciones.

**Tabla 5.1.4.3. Mutaciones, cambio de aminoácido y su probabilidad (PAM 250) en los espectros de mutantes del gen NS5A de HCVp3 pasado en ausencia o presencia de ribavirina (R)<sup>a</sup>.**

HCV p3 Sin droga			HCV p3 R 50 µM			HCV p3 R 100 µM		
Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250
A6452G	N62D	2	C6298U	-	-	G6302A	V12I	4
A6455G	I63V	4	G6446U	G60C	-3	C6339U	T24I	0
C6632U	R122C	-4	A6452G	N62D	2	C6340U	-	-
G6641A	G125R	-3	A6578G	T104A	1	C6355U	-	-
A6697G	-	-	C6768A	P167Q	0	A6452G	N62D	2
A6740G	I158V	4	C6955U	-	-	C6492U	T75I	0
A6758U	T164S	1	U7016C	Y250H	0	C6529A	-	-
G6784A	-	-	C7033A	-	-	U6535C	-	-
A6840G	E191G	0	A7035G	D256G	1	C6574U	-	-
A6877U	-	-	G7069U	Q267H	3	G6616A	-	-
U6980C	S238P	1	G7131C	S288T	1	G6631A	-	-
G7037A	A257T	1	A7158G	E297G	0	G6637A	-	-
C7057U	-	-	A7163G	M299V	2	C6721U	-	-
U7137A	L290H	-2	C7169U	P301S	1	U6786C	V173A	0
U7137C	L290P	-3	U7193C	-	-	G6815U	A183S	1
A7150G	I294M	2	G7210A	-	-	C6826U	-	-
A7163G	M299V	2	G7228U	-	-	C6853A	D195E	3
U7273C	-	-	U7273C	-	-	C6859U	-	-
U7338G	V357G	-1	A7302C	K345T	0	G6902A	E212N	1
C7410U	S381L	-3	G7304A	A346T	1	G6904U	E212N	1
A7533G	E422G	0	C7318U	-	-	G6922A	-	-
G7598A	V444I	4	U7371A	L668H	-2	G6988A	-	-
A7655G	T463A	1	C7408U	-	-	U7016C	Y250H	0
			U7409C	S381P	1	C7021U	-	-
			G7415A	G383S	1	U7023C	V252A	0
			G7439C	A391P	1	G7024U	-	-
			C7447U	-	-	C7065A	A266D	0
			G7460A	G298S	1	U7138G	-	-
			U7501C	-	-	G7173A	R302K	3
			A7533G	E422G	0	C7231U	-	-
			U7572G	L435R	-3	C7270U	-	-
			C7585U	-	-	C7307U	P347S	1
			G7598A	V444I	4	G7329C	R354P	0
			G7612U	-	-	G7439C	A391P	1
						C7447U	-	-
						C7450U	-	-
						G7457A	G397S	1
						G7484A	A406T	1
						C7487U	P407S	1
						U7515C	M416T	-1
						A7533G	E422G	0
						A7540U	-	-
						C7574G	Q436E	2
						G7588A	-	-
<b>Mutaciones distintas</b>	<b>23</b>		<b>Mutaciones distintas</b>	<b>34</b>		<b>Mutaciones distintas</b>	<b>44</b>	
<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>5 (22)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>13 (38)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>22 (50)</b>	
<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>18 (78)</b>		<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>21 (62)</b>		<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>22 (50)</b>	

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas son las del pase 3 de las infecciones descritas en la Figura 5.1.3.2.

<sup>b</sup> La numeración de los residuos del genoma de HCV se corresponde con la del genoma JFH-1 (número de acceso #AB047639). Los aminoácidos se representan según el código de una letra (explicado en Abreviaturas) y se numeran desde el aminoácido N-

terminal al C-terminal.

<sup>c</sup> Número de mutaciones sinónimas y no sinónimas, y el porcentaje de cada una de ellas.

**Tabla 5.1.4.4. Mutaciones, cambio de aminoácido y su probabilidad (PAM 250) en los espectros de mutantes del gen NS5B de HCVp3 pasado en ausencia o presencia de ribavirina (R)<sup>a</sup>.**

HCV p3 Sin droga			HCV p3 R 50 µM			HCV p3 R 100 µM		
Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250
C7735U	-	-	U7741C	-	-	C7735U	-	-
C8191U	-	-	A7762C	-	-	C7798U	-	-
A8295G	E210G	0	A7786G	-	-	A7806U	Q47L	-2
U8314G	-	-	A7840G	-	-	C7963U	-	-
G9144A	G493D	1	C7879U	-	-	G7970A	G102R	-3
A9394U	-	-	U7919C	-	-	G8185A	M173I	2
			A7965G	K100R	3	G8272A	-	-
			C7993U	-	-	A8295G	E210G	0
			C7996U	-	-	U8446G	-	-
			C8001U	S112F	-3	A8483G	T273A	1
			C8029A	-	-	C8704U	-	-
			C8132U	P156S	1	A8731G	-	-
			G8164A	-	-	C8793U	P376L	-3
			G8185A	M173I	2	C8800U	-	-
			C8191U	-	-	C8801U	R379C	-4
			C8210U	L182F	2	G8864A	V400I	4
			G8221U	-	-	U8962C	-	-
			A8295G	E210G	0	U8970A	V435D	-2
			C8347U	-	-	U9010C	-	-
			C8583U	A306V	0	A9298G	-	-
			C8662U	-	-	C9388U	-	-
			G8668A	-	-			
			U8716G	-	-			
			C8792U	P376S	1			
			C8803U	-	-			
			C8939U	-	-			
			U9377G	S571A	1			
			C9392U	-	-			
<b>Mutaciones distintas</b>	<b>6</b>		<b>Mutaciones distintas</b>	<b>28</b>		<b>Mutaciones distintas</b>	<b>21</b>	
<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>4 (67)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>19 (73)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>12 (57)</b>	
<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>2 (33)</b>		<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>9 (27)</b>		<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>9 (43)</b>	

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas son las del pase 3 de las infecciones descritas en la Figura 5.1.3.2.

<sup>b</sup> La numeración de los residuos del genoma de HCV se corresponde con la del genoma JFH-1 (número de acceso #AB047639). Los aminoácidos se representan según el código de una letra (explicado en Abreviaturas) y se numeran desde el aminoácido N-terminal al C-terminal.

<sup>c</sup> Número de mutaciones sinónimas y no sinónimas, y el porcentaje de cada una de ellas.

Para obtener datos adicionales sobre la actividad mutagénica de R, se analizó la complejidad del espectro de mutantes del gen NS5A en poblaciones obtenidas de pases de virus a una alta MOI inicial (1-2 TCID<sub>50</sub>/célula), descritos en el apartado 5.1.3. En este caso, el análisis de las cuasiespecies se realizó mediante dos metodologías distintas, clonaje molecular y secuenciación masiva. El análisis de los clones moleculares por secuenciación de Sanger (Tabla 5.1.4.5) mostró un aumento significativo de la frecuencia de mutación (2,5 veces con R 75 µM y 2,8 veces con R 100 µM) respecto a la población pasada en ausencia de R ( $p < 0.05$  y  $p < 0.005$ , respectivamente; test  $\chi^2$ ). Además, aumentó significativamente la diversidad nucleotídica en las poblaciones pasadas en presencia de R ( $p < 0.0017$ ; test de permutación).

**Tabla 5.1.4.5. Análisis de los espectros de mutantes de poblaciones de HCVp0 pasadas en ausencia o presencia de ribavirina<sup>a</sup>.**

[Ribavirina] (µM) <sup>a</sup>	Nº de pase	Nº de nt analizados (clones/haplotipos) <sup>b</sup>	Frecuencia de mutación <sup>c</sup>	Diversidad nucleotídica <sup>d</sup> $\pi \cdot 10^3$ (95 % IC)
0	4	23,766 (17/13)	$6,7 \times 10^{-4}$	0,89 (0,72-1,19)
0	5	19,572 (14/8)	$6,1 \times 10^{-4}$	0,69 (0,42-1,12)
75	4	16,766 (12/12)	$1,4 \times 10^{-3}$	1,37 (0,96-2,05)
75	5	11,899 (9/8)	$1,9 \times 10^{-3}$	2,34 (1,76-3,06)
100	4	13,980 (10/10)	$1,8 \times 10^{-3}$	2,07 (1,75-2,44)

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas son las de los pases 4 y 5 de las infecciones descritas en la Figura 5.1.3.1. La numeración de los residuos del genoma de HCV se corresponde con la del genoma JFH-I (número de acceso #AB047639). La región genómica analizada NS5A se sitúa entre el nucleótido 6269 y el 7666. El pase 5 de la línea tratada con R 100 µM no disponía de RNA molde suficiente para realizar el análisis.

<sup>b</sup> El paréntesis indica el número de clones analizados y de haplotipos encontrados (número de secuencias distintas de RNA en la población). Algunos clones analizados no se secuenciaron completamente.

<sup>c</sup> La frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones distintas encontradas (las mutaciones repetidas se cuentan una sola vez) dividido por el número total de nucleótidos secuenciados para cada población (apartado 4.16 de Materiales y Métodos).

<sup>d</sup> El cálculo de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y el intervalo de confianza (IC) se explican en apartado 4.16 de Materiales y Métodos.

Además, se observó un cambio en la distribución de los tipos de mutación. El porcentaje de transiciones respecto al número total de mutaciones no varió como resultado del tratamiento con R (82.1%, 76.6% y 88.0% en ausencia y presencia de R 75 µM y R 100 µM, respectivamente) pero el porcentaje de transiciones del tipo [(G→A)+(C→U)] respecto al número total transiciones aumentó significativamente [desde un 14.3% en ausencia de R al 59.5% y 68.0% en presencia de R 75 y R 100 µM, respectivamente ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , test  $\chi^2$ )]. Esto quedó reflejado en un aumento de la relación [(G→A)+(C→U)]/[(A→G)+(U→C)] (Tabla 5.1.4.5 y Fig. 5.1.4.2). El porcentaje de mutaciones sinónimas y no sinónimas, las sustituciones de aminoácidos y su probabilidad según la matriz de sustitución PAM 250 se muestran en el Anexo I.



	Sin droga				R 75 $\mu$ M				R 100 $\mu$ M			
	U	C	G	A	U	C	G	A	U	C	G	A
U		11	0	1		5	0	2		0	0	0
C	2		1	0	19		1	1	12		0	1
G	2	1		2	1	3		9	1	0		5
A	0	0	8		1	1	3		0	1	5	
$\frac{[(G \rightarrow A) + (C \rightarrow U)]}{[(A \rightarrow G) + (U \rightarrow C)]}$				0.21	3.50				3.40			

**Figura 5.1.4.2. Matrices de tipos de mutaciones en el espectro de mutantes de poblaciones de HCV que han sido pasadas en ausencia o presencia de ribavirina a alta MOI.** Las mutaciones (de los nucleótidos escritos verticalmente a los escritos horizontalmente) se contabilizan en los clones individuales analizados en cada población respecto a su secuencia consenso (que no varía respecto a la del aislado JFH-1). Se representan en rojo las transiciones que aumentan como consecuencia del tratamiento con R. La relación  $[(G \rightarrow A) + (C \rightarrow U)] / [(A \rightarrow G) + (U \rightarrow C)]$  está indicada en el recuadro debajo de cada matriz. Las poblaciones analizadas son las de los pases 4 y 5 de las infecciones descritas en la Figura 5.1.3.1.

Los análisis de los espectros de mutantes de poblaciones obtenidas a partir de infecciones realizadas con una alta o baja MOI inicial de HCV muestran resultados similares que nos permiten concluir que en el sistema de replicación de HCV en células Huh-7.5 la R es mutagénica para el virus.

La secuenciación masiva (UDPS) es un método alternativo para el análisis de cuasiespecies virales que proporciona un muestreo alternativo al del clonaje molecular (Gregori et al, 2014; Marz et al, 2014). Se analizaron seis amplicones, que abarcan el gen NS5A completo, en poblaciones de HCVp0 pasadas 4 veces en ausencia o en presencia de R 75  $\mu$ M. Los resultados (Tabla 5.1.4.6, Fig. 5.1.4.3 y Anexo 2) muestran un aumento del número de mutaciones distintas, sitios polimórficos, haplotipos y proporción  $[(G \rightarrow A) + (C \rightarrow U)]$  respecto al total de mutaciones en poblaciones pasadas en presencia de R (9,7% y 60,0% en ausencia de R y R 75  $\mu$ M, respectivamente). El porcentaje de transiciones del tipo  $[(G \rightarrow A) + (C \rightarrow U)]$  respecto al número total de transiciones aumentó significativamente [desde un 28,0% en ausencia de R a un 75,0% en presencia de R 75 ( $p < 0.02$ , test  $\chi^2$ )]. Esto quedó reflejado en un aumento de la relación  $[(G \rightarrow A) + (C \rightarrow U)] / [(A \rightarrow G) + (U \rightarrow C)]$ . Por tanto, los análisis de secuenciación masiva también indican que R ejerce una actividad mutagénica sobre HCV en nuestro sistema experimental.

**Tabla 5.1.4.6. Análisis por secuenciación masiva de poblaciones de HCVp0 pasadas en ausencia o presencia de ribavirina<sup>a</sup>.**

Parámetro	[Ribavirina] (μM) <sup>a</sup>	Amplicón de NS5A <sup>b</sup>					
		A1 (6152-6454)	A2 (6446-6767)	A3 (6737-6954)	A4 (6910-7252)	A5 (7224-7550)	A6 (7432-7725)
N° de mutaciones distintas	0	3	7	5	15	4	7
	75	18	25	15	35	22	24
Sitios polimórficos	0	3	7	5	14	4	6
	75	18	24	15	34	21	24
N° de haplotipos <sup>c</sup>	0	4 (3/0)	8 (7/0)	6 (5/0)	16 (12/3)	4 (2/1)	8 (6/1)
	75	18 (15/2)	26 (24/1)	16 (14/1)	35 (31/3)	22 (19/2)	25 (21/3)
[(G→A)+(C→U)] <sup>d</sup>	0	2 (2/1)	0 (0/6)	0.25 (1/4)	0.50 (4/8)	1 (1/1)	0.33 (1/3)
[(A→G)+(U→C)]	75	3,5 (28/8)	2,83 (17/6)	6,5 (13/2)	1,45 (16/11)	13 (13/1)	3,75 (15/4)

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas son las del pase 4 de las infecciones realizadas a alta MOI inicial descritas en la Figura 5.1.3.1. La numeración de los residuos del genoma de HCV se corresponde con la del genoma JFH-I (número de acceso #AB047639). La región genómica analizada NS5A se sitúa entre el nucleótido 6152 y el 7725.

<sup>b</sup> El número de nucleótidos secuenciados fue de  $2,1 \times 10^6$  a  $3,3 \times 10^6$ , y el número de lecturas por amplicón fue de 10,000. Los procedimientos se detallan en el apartado 4.15 de Materiales y Métodos.

<sup>c</sup> Los números en paréntesis indican el número de haplotipos con una o dos mutaciones, respectivamente.

<sup>d</sup> Los números en paréntesis indican el número de mutaciones del tipo [(G→A) y (C→U)] y [(A→G) y (U→C)], respectivamente. Estos valores nos permitieron calcular la relación de unas respecto a otras.

Sin droga		R 75 μM	
↖	U C G A	↖	U C G A
	U C G A		U C G A
U	13 2 1	U	12 3 2
C	5 0 3	C	49 3 9
G	1 0 4	G	5 2 34
A	0 2 10	A	1 3 16
$\frac{[(G \rightarrow A) + (C \rightarrow U)]}{[(A \rightarrow G) + (U \rightarrow C)]} = 0.21$		$2.96$	

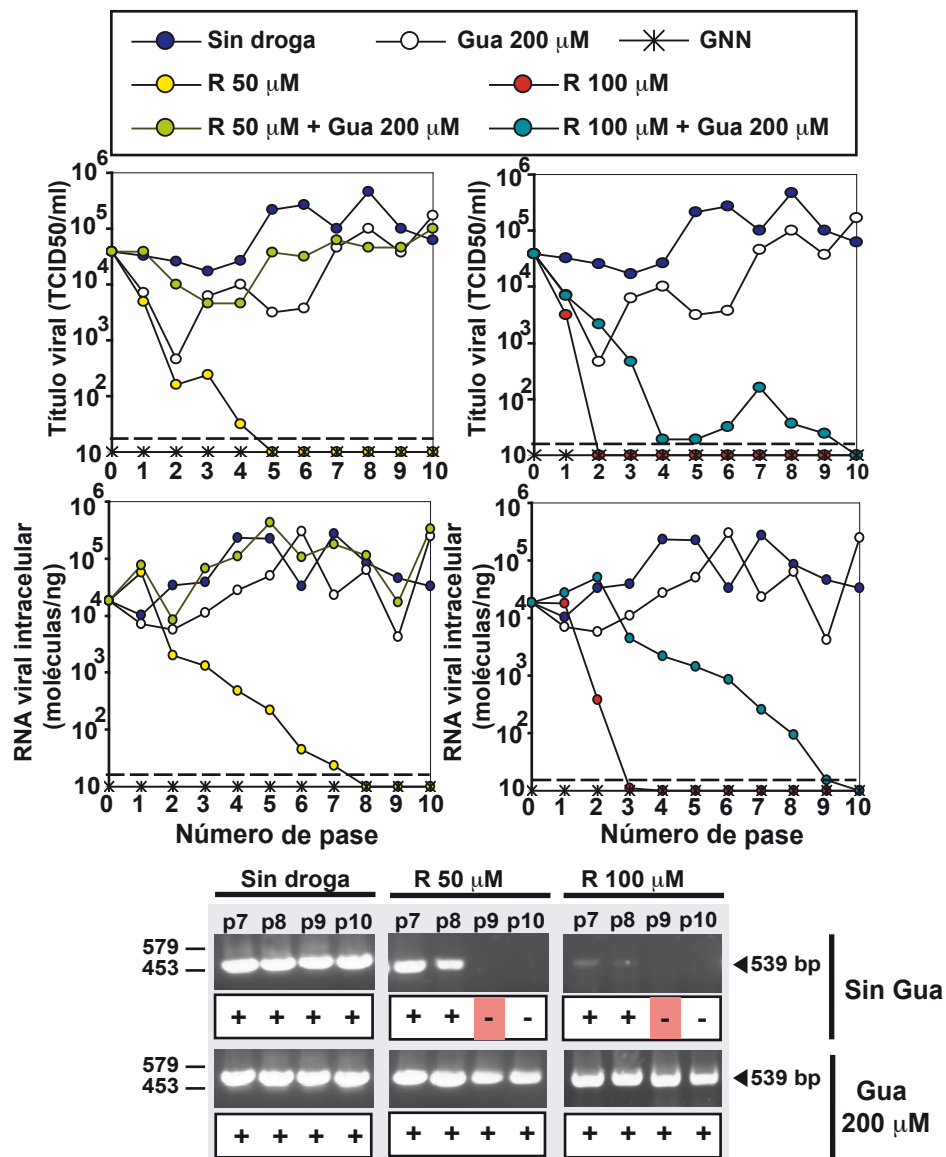
**Figura 5.1.4.3. Matrices de tipos de mutaciones en el espectro de mutantes de poblaciones de HCV que han sido pasadas en ausencia o presencia de ribavirina a alta MOI.** Las mutaciones (de los nucleótidos escritos verticalmente a los escritos horizontalmente) se obtuvieron por UDPS, se incluyen mutaciones repetidas entre amplicones solapantes. Se representan en rojo las transiciones que aumentan como consecuencia del tratamiento con R. La relación  $[(G \rightarrow A) + (C \rightarrow U)] / [(A \rightarrow G) + (U \rightarrow C)]$  está indicada en el recuadro debajo de cada matriz. Las poblaciones analizadas se corresponden con el pase 4 de las infecciones descritas en la Figura 5.1.3.1.

#### **5.1.5. Efecto de la guanosina sobre la actividad inhibidora y mutagénica de la ribavirina. Alteración de los niveles de nucleótidos intracelulares en células Huh-7.5 reporter.**

R es metabolizada por enzimas celulares para producir los derivados de nucleósidos mono-, di- y trifosfato (RMP, RDP, RTP, respectivamente) (Streeter et al, 1973; Zimmerman & Deeprase, 1978) (apartado 2.6.1.1 de Introducción). RMP actúa como un inhibidor competitivo de la IMPDH lo que provoca una reducción del nivel intracelular de GTP que puede favorecer la incorporación de nucleótidos erróneos por falta de disponibilidad de GTP (Franklin & Cook, 1969; Snell, 2001; Streeter et al, 1973). En estudios anteriores se ha descrito que el nucleósido guanosina (Gua) puede revertir la inhibición de la IMPDH por la RMP y restaurar niveles intracelulares de GTP (apartado 2.6.1 de Introducción) (Airaksinen et al, 2003; Kerr, 1987; Lanford et al, 2001; Zimmerman & Deeprase, 1978). Por tanto, la comparación de la complejidad de espectros de mutantes de poblaciones virales pasadas en presencia de R y en ausencia o presencia de Gua nos permitirá evaluar la contribución de la incorporación de R al RNA frente a la depleción de GTP en la mutagénesis por R.

Se analizó el efecto de la adición de Gua en el medio de cultivo sobre la replicación de HCV en presencia de R. La presencia de Gua 200  $\mu$ M sin R causó una disminución de la producción de progenie infecciosa de HCV y de RNA viral intracelular de 10 a 100 veces hasta el pase 5, y una posterior recuperación entre los pases 6 al 10 (Fig. 5.1.5.1). La adición de Gua anuló parcialmente la inhibición ejercida por R 50  $\mu$ M, pero fue mínima la compensación ejercida sobre R 100  $\mu$ M. Para las dos concentraciones de R utilizadas, la presencia de Gua retrasó la extinción de HCV mediada por la droga (Fig. 5.1.5.1).

La adición de Gua causó solamente una ligera reducción de la complejidad del espectro de mutantes asociada a la presencia de R (Tabla 5.1.5.1). La diversidad nucleotídica y la relación  $[(G \rightarrow A) + (C \rightarrow U)] / [(A \rightarrow G) + (U \rightarrow C)]$  disminuyeron un máximo de 1,7 veces, en presencia de Gua y R. La relación  $[(G \rightarrow A) + (C \rightarrow U)] / [(A \rightarrow G) + (U \rightarrow C)]$  en presencia de R 100  $\mu$ M + Gua siguió siendo mucho mayor que en la condición control y muy similar a la de R 100  $\mu$ M. Por tanto, a pesar de la compensación del efecto mutagénico de la R por parte de Gua, los resultados obtenidos en presencia de R y Gua también indican actividad mutagénica de R sobre HCV en nuestro sistema experimental (Tabla 5.1.5.1 y Fig. 5.1.5.2; Anexo 3).



**Figura 5.1.5.1. Efecto de la ribavirina y la guanosina sobre la producción de progenie infecciosa y RNA viral intracelular.** Se infectaron células Huh-7.5 reporter con HCVp0 a una MOI de 0,1-0,2 TCID<sub>50</sub>/célula, en ausencia o presencia de las concentraciones de R y Gua que se indican en el cuadro superior. Se llevaron a cabo infecciones con HCV GNN en paralelo (control negativo). Se usó la progenie de cada infección para infectar células en un nuevo pase (apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos). Se determinó la infectividad en el sobrenadante de los cultivos celulares (paneles superiores), y se midió el RNA viral intracelular por RT-PCR cuantitativa (paneles inferiores) (apartados 4.6.3 y 4.12 de Materiales y Métodos). La línea discontinua paralela al eje de abscisas indica el límite de detección de la infectividad y del RNA viral intracelular. En el cuadro inferior se muestran las bandas de amplificación de 539 pb generadas por una RT-PCR altamente sensible en la que se usa como molde RNA viral intracelular de los pases indicados, los signos + y - indican presencia o ausencia de banda de amplificación (apartado 4.13 de Materiales y Métodos).

**Tabla 5.1.5.1. Análisis de las cuasiespecies de poblaciones de HCVp0 pasadas en ausencia o presencia de ribavirina y guanosina <sup>a</sup>.**

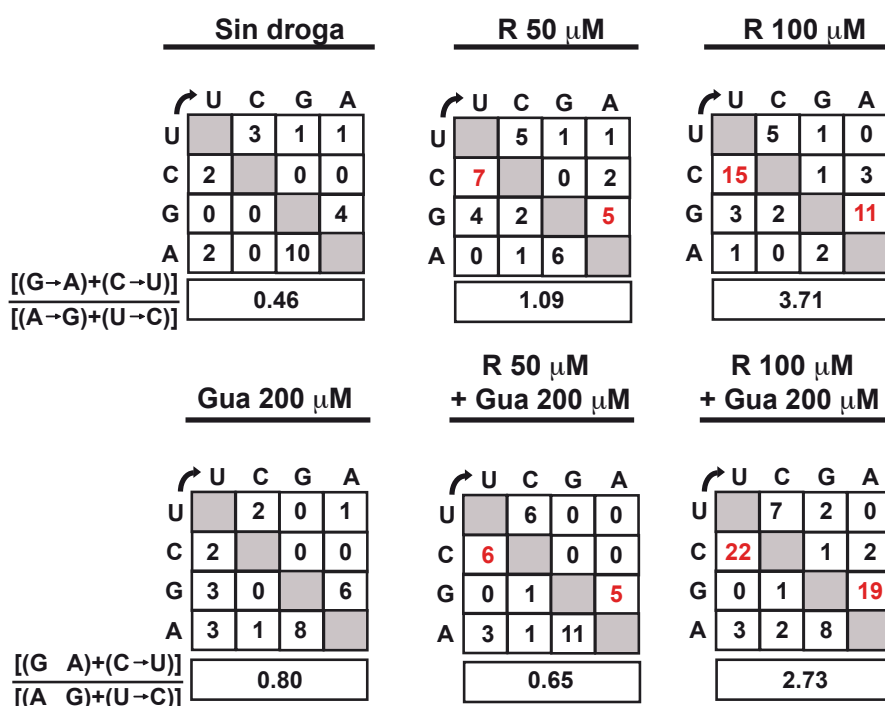
[Ribavirina] ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	[Guanosina] ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	N° de nt analizados (clones/haplotipos) <sup>b</sup>	Frecuencia de mutación <sup>c</sup>	Diversidad nucleotídica <sup>d</sup> $\pi \cdot 10^3$ (95 % IC)
0	0	29,704 (22/18)	$7,7 \times 10^{-4}$	1,16 (0,93-1,51)
0	200	30,493 (24/17)	$8,5 \times 10^{-4}$	1,36 (1,09-1,68)
50	0	23,766 (17/17)	$1,4 \times 10^{-3}$	1,54 (1,16-2,11)
50	200	35,979 (27/17)	$9,2 \times 10^{-4}$	1,39 (1,17-1,72)
100	0	21,396 (20/20)	$2,0 \times 10^{-3}$	2,43 (1,99-3,44)
100	200	38,125 (28/26)	$1,7 \times 10^{-3}$	2,36 (2,04-2,79)

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas son las del pase 3 de las infecciones descritas en la Figura 5.1.5.1. La numeración de los residuos del genoma de HCV se corresponde con la del genoma JFH-I (número de acceso #AB047639). La región genómica analizada es la del gen NS5A.

<sup>b</sup> El paréntesis indica el número de clones analizados y de haplotipos encontrados (número de secuencias distintas de RNA en la población). Algunos clones analizados no se secuenciaron completamente.

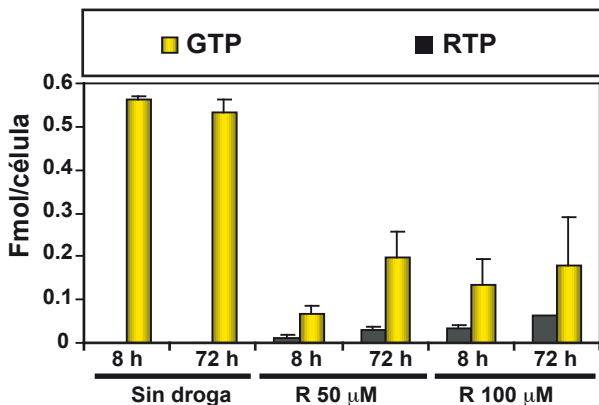
<sup>c</sup> La frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones distintas encontradas (las mutaciones repetidas se cuentan una sola vez) dividido por el número total de nucleótidos secuenciados para cada población (apartado 4.16 de Materiales y Métodos).

<sup>d</sup> El cálculo de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y el intervalo de confianza (IC) se explican en apartado 4.16 de Materiales y Métodos.



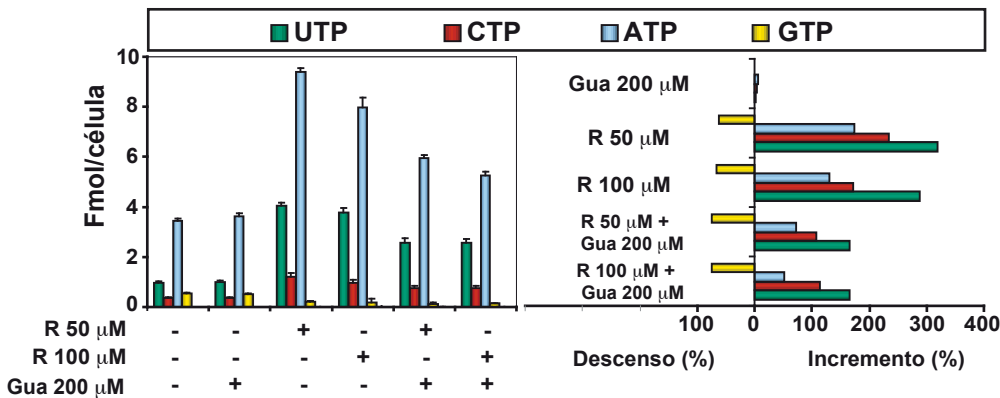
**Figura 5.1.5.2. Matrices de tipos de mutaciones en el espectro de mutantes de poblaciones de HCV que han sido pasadas en ausencia o presencia de ribavirina y guanosina a baja MOI.** Las mutaciones (de los nucleótidos escritos verticalmente a los escritos horizontalmente) se contabilizan en los clones individuales analizados en cada población respecto a su secuencia consenso (que no varía respecto a la del aislado JFH-I). Se representan en rojo las transiciones que aumentan como consecuencia del tratamiento con R. La relación  $\frac{[(G \rightarrow A) + (C \rightarrow U)]}{[(A \rightarrow G) + (U \rightarrow C)]}$  está indicada en el recuadro debajo de cada matriz. Las poblaciones analizadas son las del pase 3 de las infecciones descritas en las Figuras 5.1.5.1.

Dado que tanto R como Gua alteran los niveles de nucleótidos intracelulares se midió la cantidad de GTP y RTP en las células Huh-7.5 reporter después del tratamiento con R 50 y R 100  $\mu\text{M}$  a las 8 y 72 horas tras la adición de R. Los resultados (Fig. 5.1.5.3) muestran una reducción de la concentración intracelular de GTP de 3,0 a 8,5 veces que es estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$  en todos los casos, t-test). La RTP alcanzó niveles máximos de 0,07 Fmol/célula a las 72 horas del tratamiento con R 100  $\mu\text{M}$ .



**Figura 5.1.5.3. Nivel intracelular de GTP y RTP en células Huh-7.5 reporter tras 8 o 72 horas de exposición a la ribavirina.** Se realizaron 6 determinaciones por condición. Se representan los promedios y las desviaciones estándar en cada caso para cada uno de los tiempos analizados. Los procedimientos se describen en el apartado 4.17 de Materiales y Métodos.

Al contrario de lo observado sobre el GTP, la concentración del resto de nucleótidos aumentó como resultado del tratamiento con R (4,2 veces el UTP, 3,4 veces el CTP y 2,7 veces el ATP) (Fig. 5.1.5.4). Contrariamente a lo esperado, la adición de Gua en las células Huh-7.5 reporter no restauró la bajada de GTP causada por la R, aunque el incremento del resto de nucleótidos se redujo parcialmente en presencia de Gua, lo cual puede estar relacionado con la atenuación del efecto de R por parte de Gua.

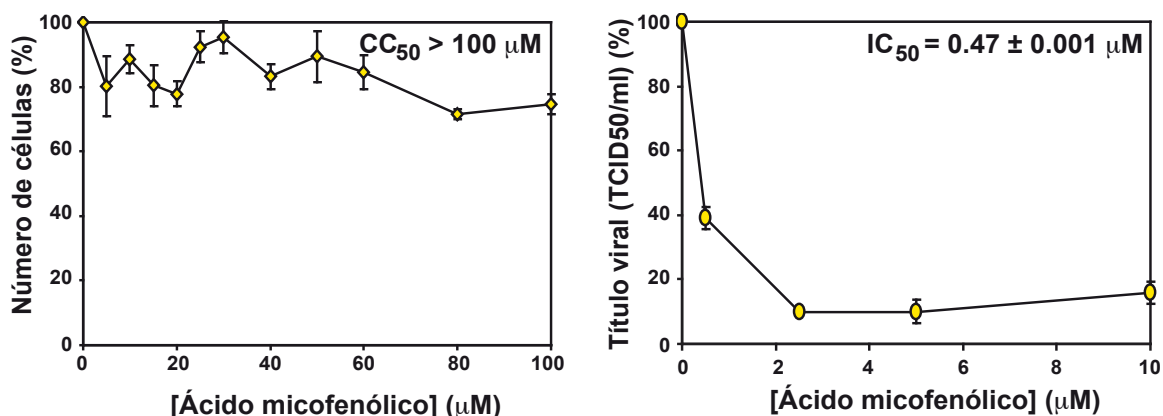


**Figura 5.1.5.4. Efecto de la guanosina y la ribavirina sobre el nivel de nucleótidos intracelulares en células Huh-7.5 reporter.** Se representa la cantidad intracelular de los 4 nucleósidos-trifosfato tras 72 horas de exposición (izquierda) y la variación de cada nucleósido-trifosfato respecto al control (derecha). Se realizaron 6 determinaciones por condición. Nótese que la máxima disminución posible es 100%. Los procedimientos se describen en el apartado 4.17 de Materiales y Métodos.

### 5.1.6. Efecto del ácido micofenólico sobre la producción de progenie viral y RNA viral intracelular. Alteración de los niveles de nucleótidos intracelulares en células Huh-7.5 reporter.

En vista de estos resultados, fue interesante examinar el efecto del MPA sobre la producción de progenie y la complejidad de los espectros de mutantes de poblaciones de HCV. MPA es un inhibidor de la IMPDH que al contrario de lo que ocurre con la RTP no puede ser incorporado al RNA (Franklin & Cook, 1969; Lee et al, 1985; Lowe et al, 1977; Sintchak et al, 1996). El MPA permite analizar si la bajada del nivel intracelular de GTP afecta a la producción de progenie viral infecciosa, así como evaluar la actividad mutagénica que podría causar estar bajada.

En primer lugar se procedió a analizar el efecto citotóxico e inhibitorio del MPA. Para conocer el efecto citotóxico del MPA se determinó la concentración que reduce la viabilidad celular al 50% ( $CC_{50}$ ). Para ello células Huh-7.5 reporter se incubaron con concentraciones crecientes de MPA (0 a 100  $\mu M$ ) y se determinó la viabilidad de las células 72 horas después del tratamiento. El MPA no resultó ser tóxico para las células en las concentraciones testadas por lo que no se pudo calcular un valor de  $CC_{50}$  (Fig. 5.1.6.1). Paralelamente, para cuantificar la inhibición de la producción de progenie infecciosa de HCV ( $IC_{50}$ ) se infectaron células Huh-7.5 reporter con HCVp0 a una MOI de 0,2-0,5  $TCID_{50}$ /célula en presencia de concentraciones crecientes de MPA y se midió la producción de progenie infecciosa. El valor de  $IC_{50}$  se muestra en la Fig. 5.1.6.1. A partir de los datos de  $CC_{50}$  e  $IC_{50}$  se calculó el índice terapéutico ( $TI = CC_{50}/IC_{50}$ ) para MPA, obteniéndose un valor de  $TI > 212,8$ . Este valor indica una buena eficacia y sirvió como referencia para la elección de las concentraciones a usar en los experimentos.



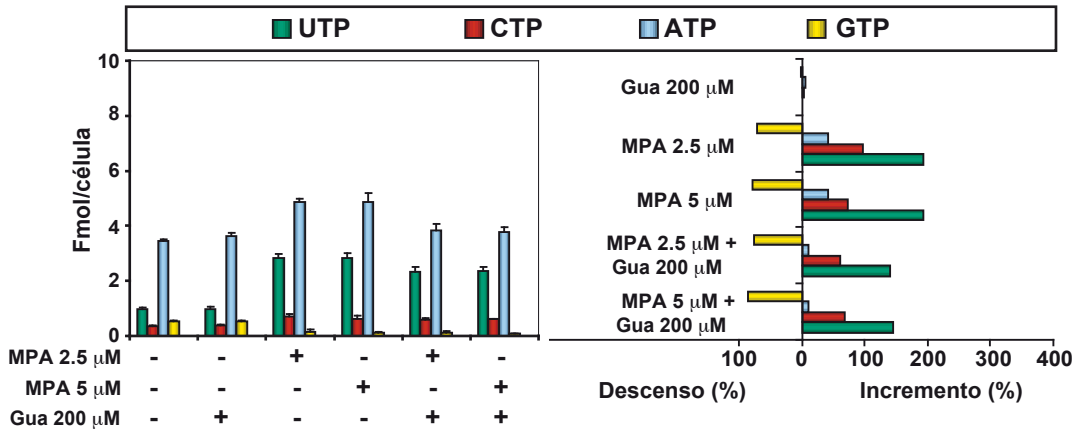
**Figura 5.1.6.1. Cuantificación de la toxicidad para las células Huh-7.5 reporter y de la inhibición de la producción de progenie infecciosa de HCV por ácido micofenólico.** Las determinaciones de la concentración citotóxica 50 ( $CC_{50}$ ) y de la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) se llevaron a





**Figura 5.1.6.2. Efecto del ácido micofenólico y la guanosina sobre la producción de progenie infecciosa y RNA viral intracelular en infecciones de HCV.** Se infectaron células Huh-7.5 reporter con HCVp0 a una MOI de 0,1-0,2 TCID<sub>50</sub>/célula, en ausencia o presencia de las concentraciones de MPA y Gua que se indican en el cuadro superior. Se llevaron a cabo infecciones con HCV GNN en paralelo (control negativo). Se usó la progenie de cada infección para infectar células en un nuevo pase (apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos). Se determinó la infectividad en el sobrenadante de los cultivos celulares (paneles superiores), y se midió el RNA viral intracelular por RT-PCR cuantitativa (paneles inferiores) (apartados 4.6.3 y 4.12 de Materiales y Métodos). La línea discontinua paralela al eje de abscisas indica el límite de detección de la infectividad y del RNA viral intracelular. Los experimentos de pases sin droga o en presencia de Gua son los mismos que los descritos en la Fig. 5.1.5.1 y se incluyen aquí para favorecer las comparaciones. En el cuadro inferior se muestran las bandas de amplificación de 539 pb generadas por una RT-PCR altamente sensible en la que se usa como molde RNA viral intracelular de los pases indicados, los signos + y - indican presencia o ausencia de banda de amplificación (apartado 4.13 de Materiales y Métodos).

Se analizaron los niveles de nucleótidos intracelulares en células Huh-7.5 reporter tratadas con MPA y Gua. La bajada de GTP producida por el MPA fue comparable a la producida por R y en este caso tampoco se compensó la bajada de GTP por la adición de Gua. La Gua compensó ligeramente el aumento de concentración de los otros nucleótidos estándar que fue de 1,5 a 4 veces menor que en el tratamiento con R (comparar Fig. 5.1.5.4 y 5.1.6.3.).



**Figura 5.1.6.3. Efecto de la guanosina y el ácido micofenólico sobre el nivel de nucleótidos intracelulares en células Huh-7.5 reporter.** Se representa la cantidad intracelular de los 4 nucleósidos-trifosfato tras 72 horas de exposición (izquierda) y la variación de cada nucleósido-trifosfato respecto al control (derecha). Se realizaron 6 determinaciones por condición. Los datos de nucleótidos de las condiciones sin droga o en presencia de Gua son los mismos que los descritos en la Fig. 5.1.5.4 y se incluyen aquí para favorecer las comparaciones. Nótese que la máxima disminución posible es 100%. Los procedimientos se describen en el apartado 4.17 de Materiales y Métodos.

Tras pases seriados en presencia de MPA el aumento de complejidad del espectro de mutantes y la variación del sesgo mutacional no fueron estadísticamente significativos (Fig. 5.1.6.4, Tabla 5.1.6.1 y Anexo 4). Los resultados sugieren que la bajada de GTP contribuye a la inhibición de la producción de progenie de HCV aunque no implica una actividad mutagénica (ver el apartado 6 de Discusión).

**Tabla 5.1.6.1. Análisis de las cuasiespecies de poblaciones de HCVp0 pasadas en ausencia o presencia de ácido micofenólico y guanosina <sup>a</sup>.**

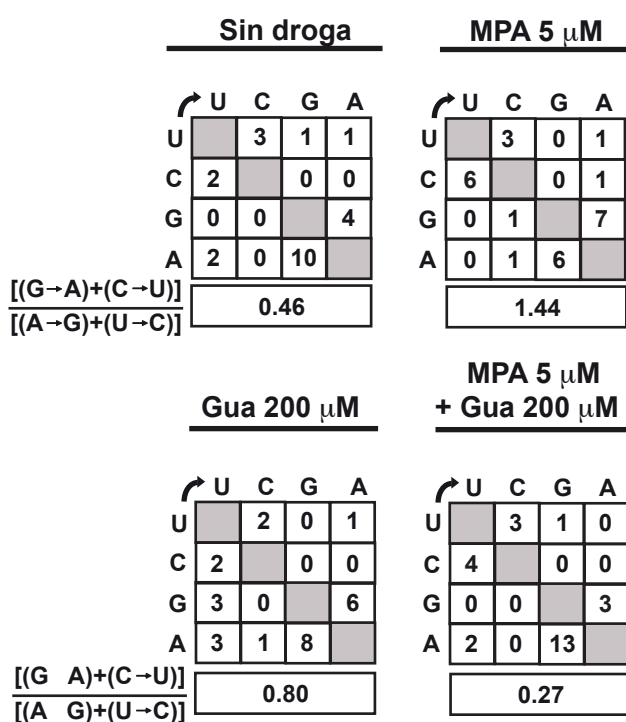
[MPA] (μM) <sup>a</sup>	[Guanosina] (μM) <sup>a</sup>	Nº de nt analizados (clones/haplotipos) <sup>b</sup>	Frecuencia de mutación <sup>c</sup>	Diversidad nucleotídica <sup>d</sup> $\pi \cdot 10^3$ (95 % IC)
0	0	29,704 (22/18)	$7,7 \times 10^{-4}$	1,16 (0,93-1,51)
0	200	30,493 (24/17)	$8,5 \times 10^{-4}$	1,36 (1,09-1,68)
5	0	27,214 (23/15)	$9,6 \times 10^{-4}$	1,11 (0,81-1,67)
5	200	23,766 (17/12)	$1,1 \times 10^{-3}$	1,57 (0,90-2,45)

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas son las del pase 3 de las infecciones descritas en la Figura 5.1.6.1. La numeración de los residuos del genoma de HCV se corresponde con la del genoma JFH-I (número de acceso #AB047639). La región genómica analizada es la del gen NS5A.

<sup>b</sup> El paréntesis indica el número de clones analizados y de haplotipos encontrados (número de secuencias distintas de RNA en la población). Algunos clones analizados no se secuenciaron completamente.

<sup>c</sup> La frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones distintas encontradas (las mutaciones repetidas se cuentan una sola vez) dividido por el número total de nucleótidos secuenciados para cada población (apartado 4.16 de Materiales y Métodos).

<sup>d</sup> El cálculo de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y el intervalo de confianza (IC) se explican en apartado 4.16 de Materiales y Métodos.

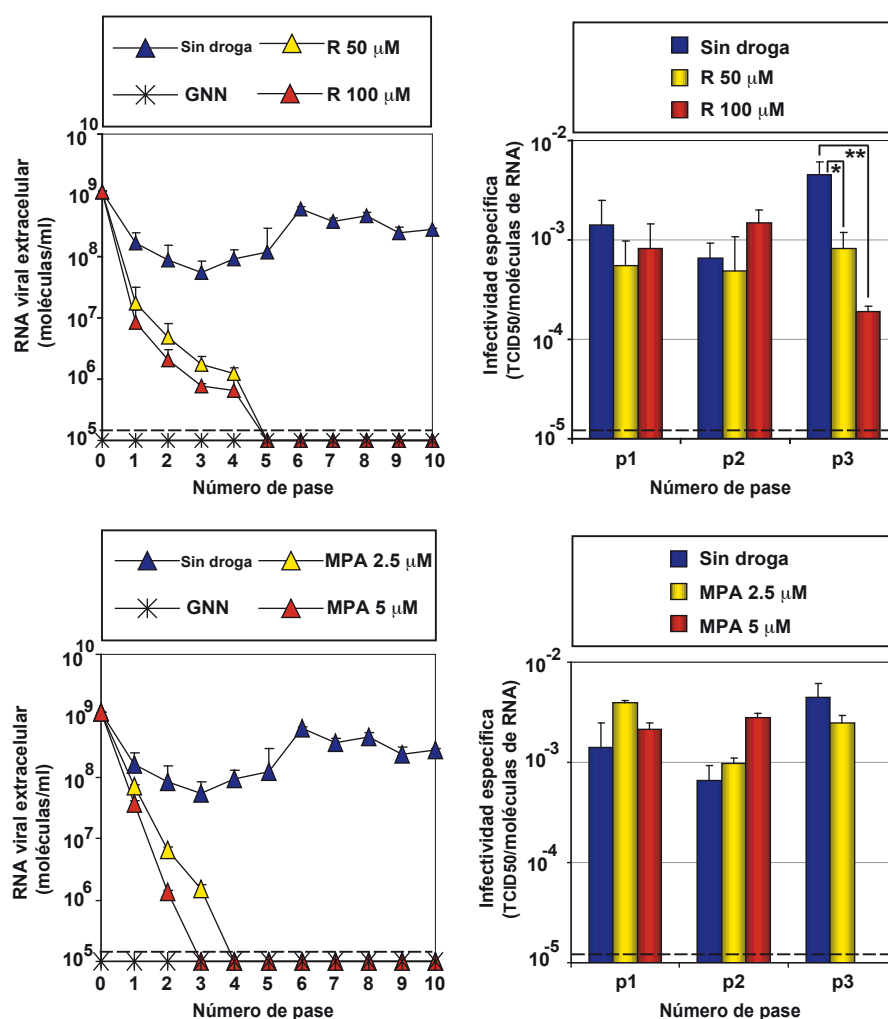


**Figura 5.1.6.4. Matrices de tipos de mutaciones en el espectro de mutantes de poblaciones de HCV que han sido pasadas en ausencia o presencia de ácido micofenólico y guanosina a baja MOI.** Las mutaciones (de los nucleótidos escritos verticalmente a los escritos horizontalmente) se contabilizan en los clones individuales analizados en cada población respecto a su secuencia consenso (que no varía respecto a la del aislado JFH-I). La relación  $[(G \rightarrow A)+(C \rightarrow U)]/[(A \rightarrow G)+(U \rightarrow C)]$  está indicada en el recuadro debajo de cada matriz. Las poblaciones analizadas son las del pase 3 de las infecciones descritas en las Figuras 5.1.6.2.

### 5.1.7. Efecto de la ribavirina y el ácido micofenólico sobre la infectividad específica y la secuencia consenso del genoma del virus de la hepatitis C.

La mutagénesis letal de virus se caracteriza por disminuciones de la infectividad específica (la infectividad dividida por la cantidad de RNA viral extracelular) y la invariabilidad de la secuencia consenso del genoma vírico (Crotty et al, 2001; Domingo et al, 2012;

González-López et al, 2005; Grande-Pérez et al, 2005a; Grande-Pérez et al, 2005b; Moreno et al, 2012). En el caso de HCV, la extinción mediada por R se produjo con una bajada de la infectividad específica de 5 a 23 veces (Fig. 5.1.7). Por el contrario, no se observaron variaciones en la infectividad específica causadas por el MPA (Fig. 5.1.7). En ambos casos la secuencia consenso permaneció constante. Por lo tanto, la extinción de HCV mediada por R, pero no por MPA, mostró características típicas de extinción por mutagénesis letal.



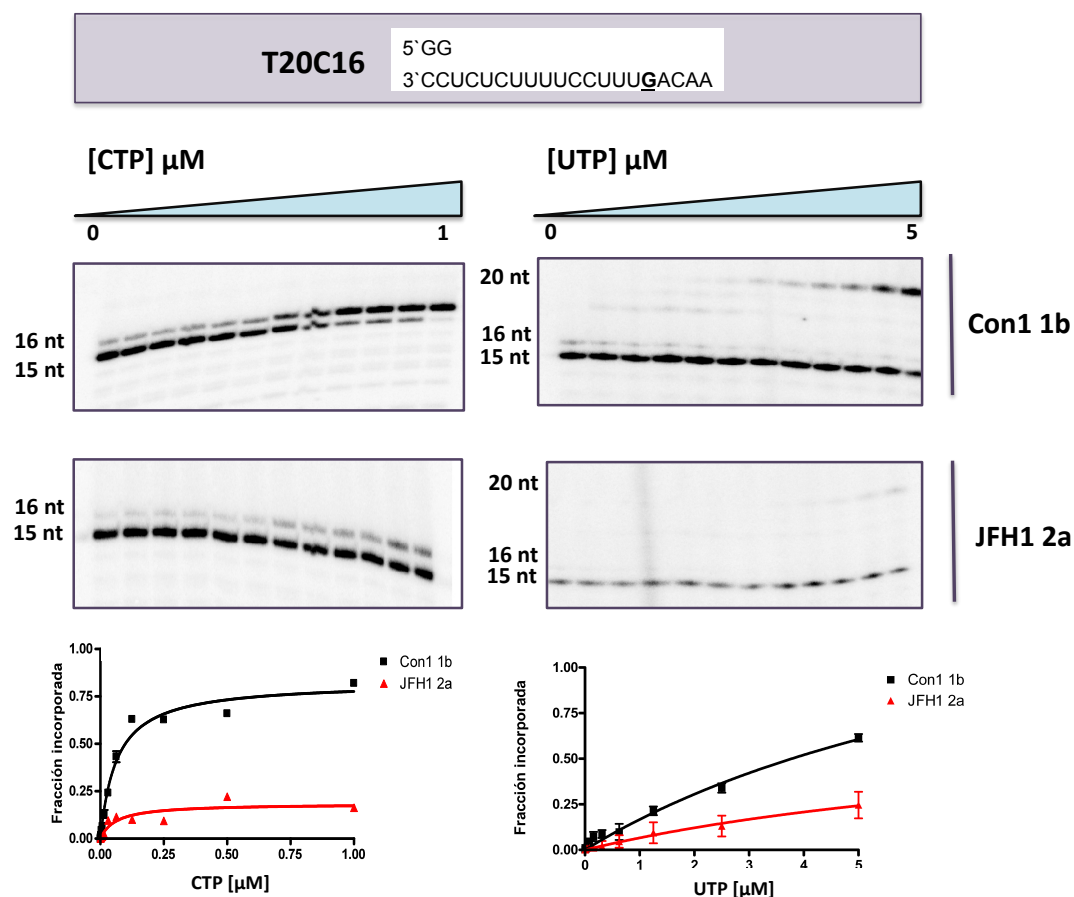
**Figura 5.1.7. Efecto de la ribavirina y el ácido micofenólico sobre la infectividad específica de HCV.** Se infectaron células Huh-7.5 reporter con HCVp0 utilizando una MOI inicial de 0.1-0.2 TCID<sub>50</sub>/célula, en ausencia o presencia de R (paneles de arriba) o de MPA (paneles de abajo) a las concentraciones indicadas. Se llevó en paralelo una infección con HCV GNN como control negativo. El experimento con R se corresponde con el de la Fig. 5.1.3.2 y con MPA con el de la Fig 5.1.6.1. Se midió el RNA viral extracelular por RT-PCR cuantitativa en diferentes pases (paneles izquierdos) y se calcularon las infectividades específicas (paneles derechos). La línea horizontal discontinua indica el límite de detección. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con uno ( $p < 0.001$ ) o dos ( $p < 0.0001$ ) asteriscos (análisis de varianza de una sola vía tal como se detalla en el apartado 4.16 de Materiales y Métodos).

### 5.1.8. Ensayos bioquímicos de fidelidad y reconocimiento de ribavirina.

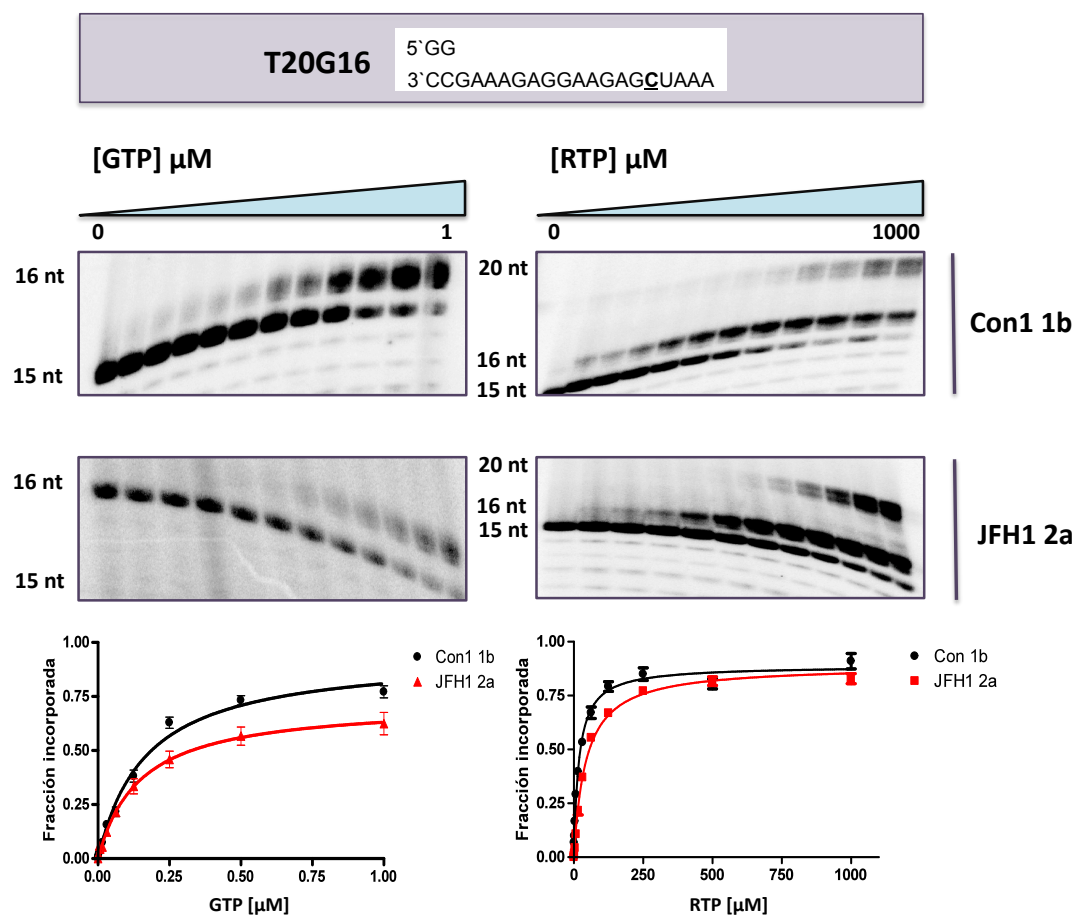
Los datos anteriores muestran que R ejerce una actividad mutagénica sobre HCV. A continuación, nos pareció interesante evaluar la incorporación de R por la polimerasa vírica utilizando ensayos bioquímicos. Estos experimentos se realizaron durante una estancia breve en el laboratorio del Dr. Matthias Götte en la Universidad de McGill (Canadá). Los ensayos se detallan en el apartado 4.18 de Materiales y métodos.

Se utilizaron dos polimerasas de distinto genotipo de HCV, las de los aislados Con1 (genotipo 1b) y JFH-1 (genotipo 2a). Primeramente, y como ensayo preliminar para testar la actividad de las polimerasas NS5B, se realizaron ensayos de incorporación de UMP y CMP frente a G. Este ensayo además, nos permitió comparar si alguna de las polimerasas era más favorable a la formación del desapareamiento U:G. Resultados previos en el laboratorio del Dr. Götte demostraron que la frecuencia del desapareamiento U:G era muy alta en ensayos bioquímicos utilizando la polimerasa del genotipo 1b (Powdrill et al, 2011). Los resultados obtenidos muestran una mayor incorporación de UMP frente a G por parte de la polimerasa del genotipo 1b, aunque la incorporación de CMP (nucleótido correcto) también fue mayor en este caso (Fig. 5.1.8.1).

Con el fin de evaluar la incorporación de la R se realizó un ensayo de incorporación de RMP frente a C y se observó una incorporación del análogo de nucleótido muy parecida en las dos polimerasas ensayadas, siendo ligeramente mayor la incorporación por parte de la polimerasa del genotipo 1b. Cuando RMP es incorporada en la posición 16 (frente a C) de la hebra nascente no actúa como terminador de cadena, ya que la cadena llega a elongarse hasta la posición 20 cuando la cantidad de RTP en el medio es alta y para ello es necesario que R también se incorpore frente a U en la posición 17 (Figura 5.1.8.2). Estos datos concuerdan con los de trabajos anteriores en los cuales se observa la incorporación de RMP frente a U y C por parte de la polimerasa del genotipo 1b, aunque menos eficientemente que la del nucleótido correcto, A o G, respectivamente. Además, en ellos también se determina que *in vitro* la RMP no actúa como terminador de cadena, sino que tras su incorporación puede continuar sintetizándose la nueva hebra de RNA (Maag et al, 2001; Vo et al, 2003). Por tanto, los resultados obtenidos en ensayos bioquímicos son compatibles con una actividad mutagénica de R para HCV, lo que refuerza los datos obtenidos en cultivos celulares en los apartados anteriores.



**Figura 5.1.8.1. Incorporación de CMP y UMP en el molde T20C16 por las polimerasas NS5B de HCV de genotipo 1b y 2a.** Análisis electroforético de los productos que resultan de la incorporación de CMP o UMP en el molde T20C16 (en cuadro superior) por las polimerasas indicadas. El tamaño de 15 nt hace referencia al RNA elongado usando AMP y GMP como únicos sustratos, y los de 16 y 20 nt la posición del RNA elongado usando, además, CMP o UMP. Los datos están basados en las medidas densitométricas de las bandas mostradas en los geles.



**Figura 5.1.8.2. Incorporación de GMP y RMP en el molde T20G16 por las polimerasas NS5B de HCV de genotipo 1b y 2a.** Análisis electroforético de los productos que resultan de la incorporación de GMP o RMP en el molde T20G16 (en cuadro superior) por las polimerasas indicadas. El tamaño de 15 nt indica la posición del RNA elongado usando UMP y CMP como únicos sustratos, y los de 16 y 20 nt la posición del RNA elongado usando, además, GMP o RMP. Los datos están basados en las medidas densitométricas de las bandas mostradas en los geles.

## **5.2. Acción antiviral de la guanosina sobre el virus de la hepatitis C.**

La guanosina compensa la inhibición del MPA sobre HCV (Fig. 5.1.6.1), parcialmente la inhibición causada por R y los incrementos de los niveles intracelulares de nucleótidos debidos al tratamiento con R y MPA (Fig. 5.1.5.1, 5.1.5.4, 5.1.6.2 y 5.1.6.3). En el transcurso de estos experimentos se observó que Gua producía una inhibición tanto de la producción de HCV infeccioso como en los niveles de RNA viral intracelular (valores consistentemente inferiores a las de los pases control en las Figuras 5.1.5.1 y 5.1.6.2). Experimentos adicionales mostraron que concentraciones más elevadas de Gua inhibían la producción de HCV infeccioso, por lo que se cuantificó la acción inhibitoria de Gua y se comparó con la de los otros nucleósidos estándar.

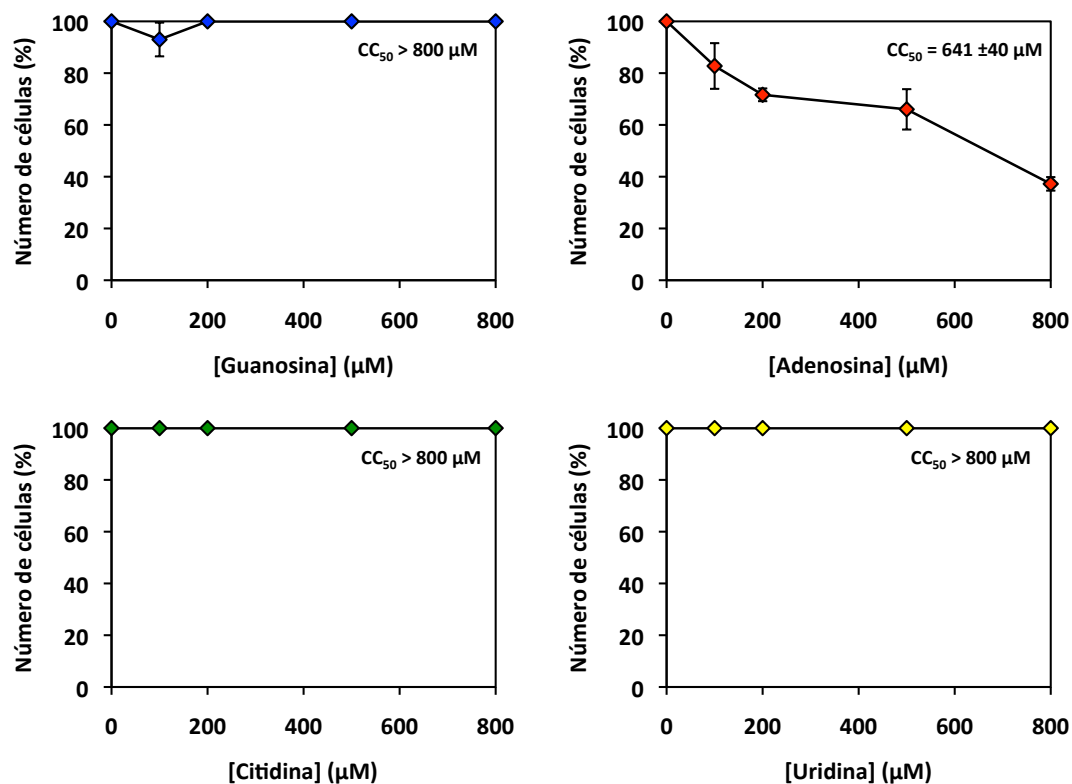
### **5.2.1. Concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) de guanosina, adenosina, citidina y uridina para células Huh-7.5 reporter.**

Para estudiar un posible efecto citotóxico de la guanosina y otros nucleósidos sobre las células Huh-7.5 reporter se determinaron las concentraciones que reducen la viabilidad celular al 50% (CC<sub>50</sub>). Para ello las células se incubaron con concentraciones crecientes de Gua, adenosina (Ade), citidina (Cit) y uridina (Uri) (de 0 a 800 µM en todos los casos) y se determinó su viabilidad 72 horas después de cada tratamiento. Sólo la adenosina mostró citotoxicidad medible con una CC<sub>50</sub> = 641±40 µM (Fig. 5.2.1). Los restantes nucleósidos, incluyendo la Gua, no mostraron toxicidad para las células Huh-7.5 en el rango de concentraciones ensayadas (Fig. 5.2.1).

### **5.2.2. Concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de guanosina, adenosina, citidina y uridina para el virus de la hepatitis C.**

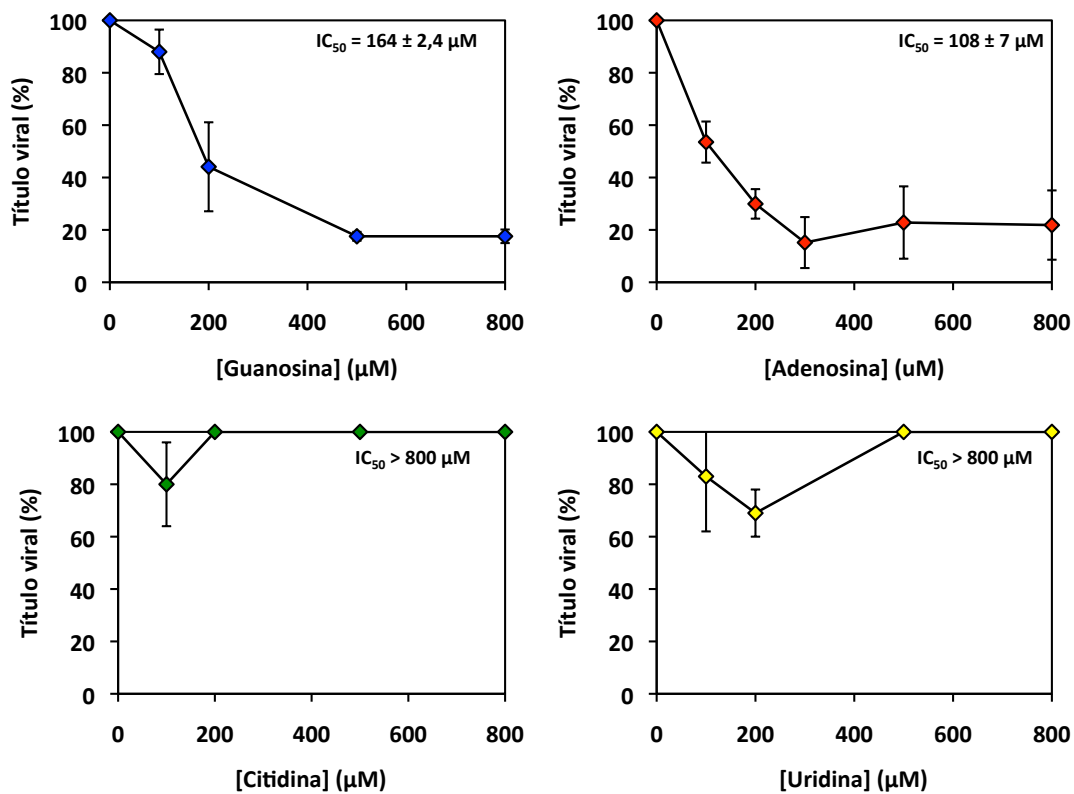
Para cuantificar la inhibición de la producción de progenie infecciosa de HCV (IC<sub>50</sub>) se infectaron células Huh-7.5 reporter con HCVp0 a una MOI de 0,05-0,1 TCID<sub>50</sub>/célula en presencia de concentraciones crecientes de los 4 nucleósidos y se midió la producción de progenie infecciosa.

Se observó inhibición por la guanosina y la adenosina, con IC<sub>50</sub> de 164±2,4 µM y 108±7 µM, respectivamente, pero no por la citidina y la uridina (Fig. 5.2.2). Asumiendo que Gua y Ade pudieran ser considerados agentes antivirales los índices terapéuticos (TI = CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>) para Gua y Ade fueron TI de >5 y 6, respectivamente.



**Figura 5.2.1. Cuantificación de la toxicidad para las células Huh-7.5 reporter de guanosina, adenosina, citidina y uridina.** Las determinaciones de la concentración citotóxica 50 ( $CC_{50}$ ) se llevaron a cabo por triplicado y se dan los valores de las desviaciones estándar. Las condiciones experimentales se describen en el apartado 4.4 de Materiales y Métodos.

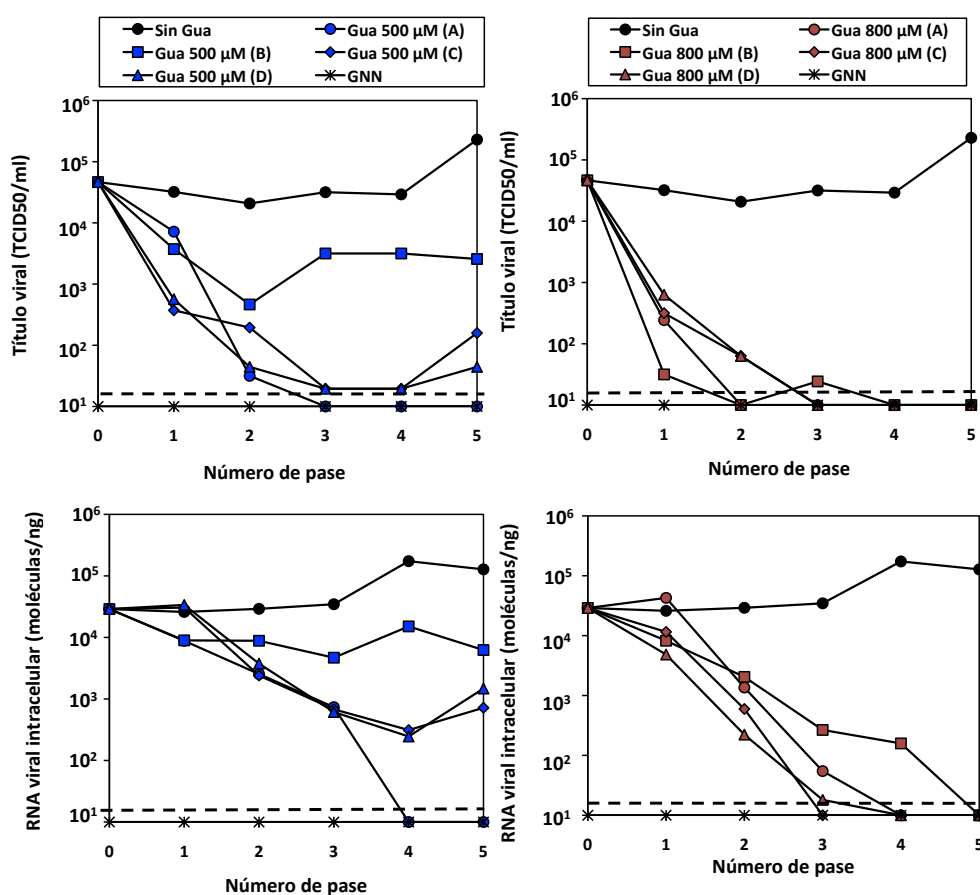




**Figura 5.2.2. Cuantificación de la inhibición sobre la producción de progenie infecciosa de HCV por guanosina, adenosina, citidina y uridina.** Las determinaciones de la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) se llevaron a cabo por triplicado y se dan los valores de las desviaciones estándar. Las condiciones experimentales se describen en los apartados 4.5 y 4.6 de Materiales y Métodos.

### 5.2.3. Efecto de la guanosina sobre el virus de la hepatitis C y sobre el nivel intracelular de nucleótidos.

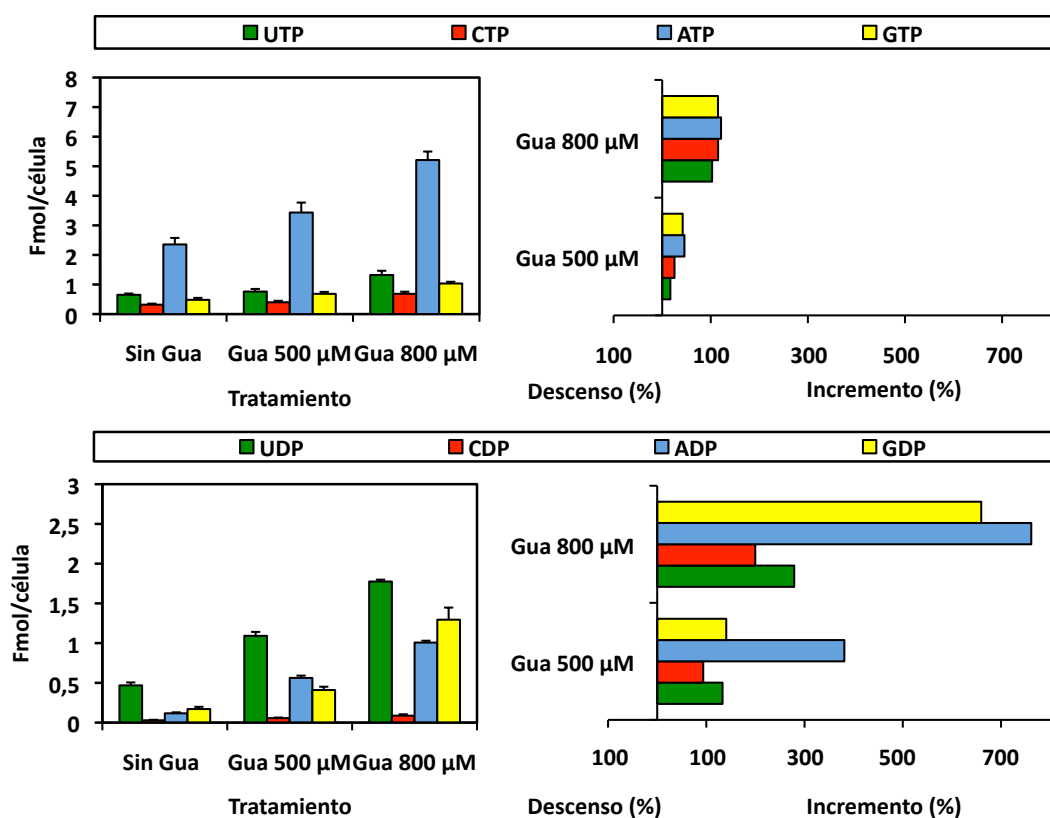
El virus HCVp0 se sometió a 5 pases seriados en células Huh-7.5 reporter, usando una MOI inicial de 0,05 TCID<sub>50</sub>/célula, tanto en ausencia como en presencia de Gua 500  $\mu$ M y 800  $\mu$ M. Los resultados muestran una bajada consistente de la infectividad y del RNA viral intracelular como resultado del tratamiento con Gua (Fig. 5.2.3.1). Se llevaron a cabo 4 réplicas (A, B, C y D) en las mismas condiciones con cada una de las concentraciones de Gua.



**Figura 5.2.3.1. Efecto de la guanosina sobre la producción de progenie infecciosa y RNA viral intracelular de HCV.** Se infectaron células Huh-7.5 reporter con HCVp0 a una MOI inicial de 0,05 TCID<sub>50</sub>/célula, en ausencia o presencia de Gua 500  $\mu$ M u 800  $\mu$ M (indicado en los cuadros superiores) (4 réplicas biológicas en cada caso nombradas A, B, C y D). Se llevaron a cabo infecciones con HCV GNN en paralelo (control negativo). Se usó la progenie de cada infección para infectar células en el siguiente pase del virus (apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos). Se determinó la infectividad en el sobrenadante de los cultivos celulares (paneles superiores), y se midió el RNA viral intracelular por RT-PCR cuantitativa (paneles inferiores) (apartados 4.6.3 y 4.12 de Materiales y Métodos). La línea discontinua paralela al eje de abscisas indica el límite de detección de la infectividad y del RNA viral.

En presencia de 500  $\mu\text{M}$  Gua se observó un descenso de la infectividad y del RNA viral intracelular, aunque sólo en una de las cuatro réplicas se alcanzaron títulos por debajo del límite de detección (Fig. 5.2.3.1). En presencia de 800  $\mu\text{M}$  Gua la infectividad y el RNA viral intracelular pasaron a ser indetectables entre los pases 2 y 4 en todas las réplicas realizadas. Las diferencias de producción de progenie viral entre las poblaciones control y tratadas con Gua 500 u 800  $\mu\text{M}$  fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$  en ambos casos; según ANOVA de dos vías tal como se detalla en el apartado 4.16 de Materiales y Métodos). El descenso de la infectividad en el sobrenadante de los cultivos celulares precedió al descenso del RNA viral intracelular.

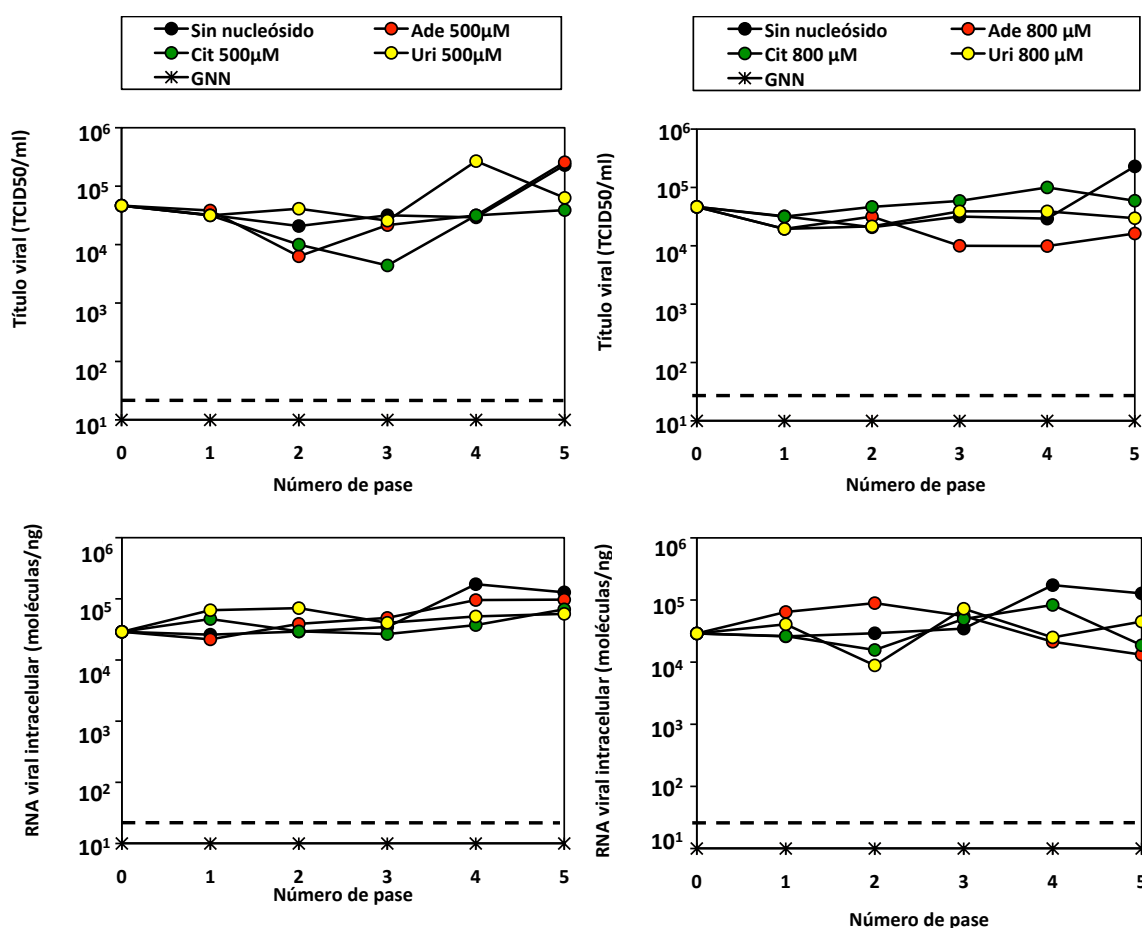
Para investigar si la inhibición por Gua podría relacionarse con alteraciones en las concentraciones intracelulares de nucleótidos, se determinó el efecto de Gua sobre el nivel de NTPs y NDPs en las células Huh-7.5 reporter 72 horas después del tratamiento (sin Gua o con Gua 500  $\mu\text{M}$  u 800  $\mu\text{M}$ ). Los resultados (Fig. 5.2.3.2) muestran incrementos del 17%, 25%, 46% y 42% de UTP, CTP, ATP y GTP, y del 133%, 94%, 381%, y 140% de UDP, CDP, ADP y GDP, respectivamente, cuando se trató con Gua 500  $\mu\text{M}$ . Los incrementos producidos por Gua 800  $\mu\text{M}$  fueron del 103%, 115%, 121% y 115% de UTP, CTP, ATP y GTP, y 279%, 200%, 762%, y 660% de UDP, CDP, ADP y GDP, respectivamente. Es decir, la presencia de Gua en el medio de cultivo aumentó los niveles de nucleótidos intracelulares de un modo dependiente de dosis. El aumento fue particularmente significativo para ADP y GDP cuando las células se tratan con Gua 800  $\mu\text{M}$  (Fig. 5.2.3.2). Ello se traduce en un gran incremento de las purinas respecto a las pirimidinas y en un descenso general de las relaciones NTP/NDP, particularmente importante en el caso de ATP/ADP que sufrió un descenso de 3,3 y 3,9 veces en las células tratadas con Gua 500 y 800  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Las alteraciones de esta relación podrían afectar al metabolismo celular y al ciclo replicativo del HCV (Ando et al, 2012; Mankouri et al, 2010) y ello podría contribuir al efecto inhibitorio de la Gua (apartado 6.2 de Discusión). Por otra parte, un desbalance de los nucleótidos con bases pirimidínicas respecto a los de bases purínicas, similar a lo aquí observado, se ha visto que puede inducir la expresión de ISGs en células 293T lo cual conlleva un efecto antiviral (Lucas-Hourani et al, 2013).



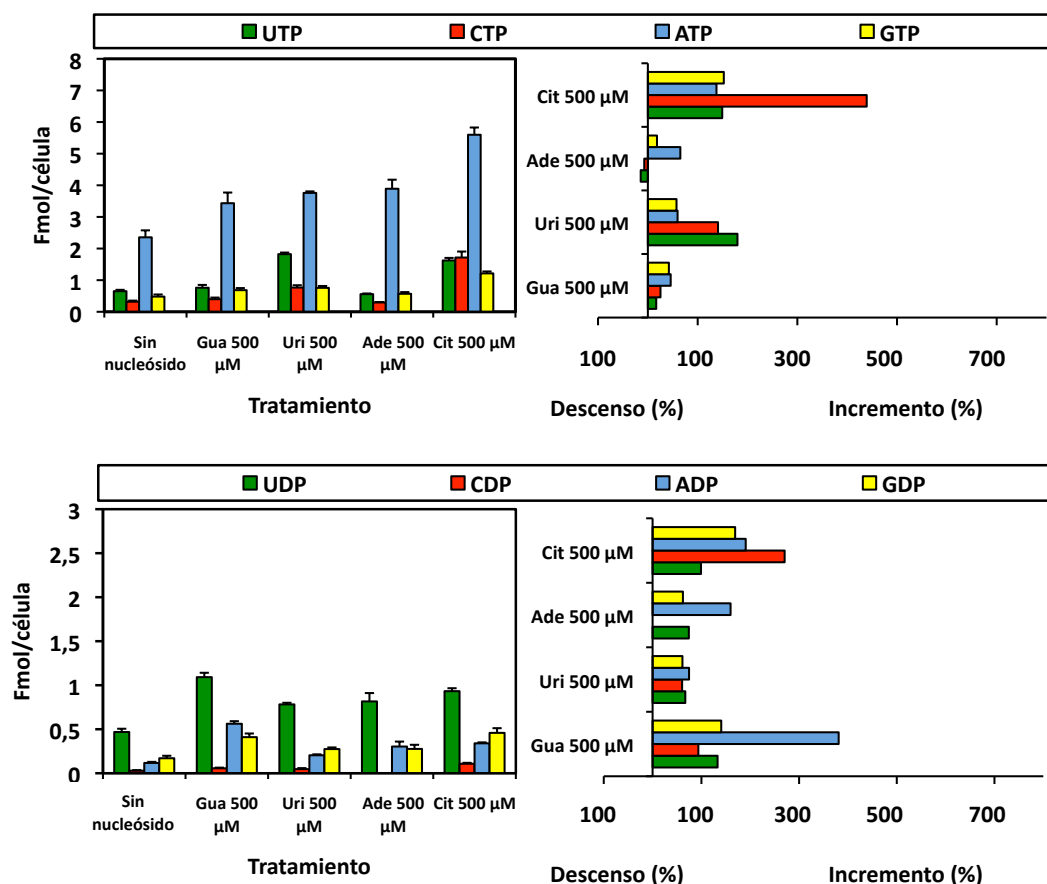
**Figura 5.2.3.2. Efecto de la guanosina sobre el nivel de nucleótidos intracelulares en células Huh-7.5 reporter.** Paneles superiores: Cantidad intracelular de los 4 nucleósidos-trifosfato tras 72 horas de exposición a las cantidades indicadas de Gua (izquierda). Variación de cada nucleósido-trifosfato respecto al control sin Gua (derecha). Paneles inferiores: Misma descripción que la correspondiente a los paneles superiores para la medida de nucleósidos-difosfato. Se realizaron 6 determinaciones por condición. En el cuadro inferior se indica la relación de concentraciones de trifosfato a difosfato para cada uno de los nucleótidos. Los valores se calcularon dividiendo el promedio de Fmol/célula del nucleósido-trifosfato por el promedio de Fmol/célula del nucleósido-difosfato correspondiente a cada uno de los tratamientos. Los procedimientos se describen en el apartado 4.17 de Materiales y Métodos.

#### 5.2.4. Efecto de otros nucleósidos sobre el virus de la hepatitis C y sobre el nivel intracelular de nucleótidos.

Para determinar si otros nucleósidos estándar también inhibían la producción de HCV, HCVp0 fue sometido a 5 pases seriados en células Huh-7.5 reporter, usando una MOI inicial de 0,05 TCID<sub>50</sub>/célula, tanto en ausencia como en presencia de Ade, Cit y Uri a concentraciones de 500  $\mu$ M y 800  $\mu$ M. Los resultados no mostraron bajada de infectividad ni de RNA viral intracelular de HCV a lo largo de los pases (Fig. 5.2.4.1). Paralelamente, se determinó el efecto del tratamiento con Ade, Cit, Uri y Gua 500  $\mu$ M sobre el nivel intracelular de nucleótidos. Para ello se midieron las cantidades de NTPs y NDPs en células Huh-7.5 reporter tras 72 horas de tratamiento con 500  $\mu$ M de cada uno de los nucleósidos (Fig. 5.2.4.2).



**Figura 5.2.4.1. Efecto de concentraciones altas de adenosina, citidina y uridina sobre el virus de la hepatitis C.** Se infectaron células Huh-7.5 reporter con HCVp0 a una MOI inicial de 0,05 TCID<sub>50</sub>/célula, en ausencia o presencia de 500  $\mu$ M u 800  $\mu$ M de Ade, Cit y Uri, tal y como se indica en los cuadros superiores. Se llevaron a cabo infecciones con HCV GNN en paralelo (control negativo). Se usó la progenie de cada infección para infectar células en el siguiente pase del virus (apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos.) Se determinó la infectividad en el sobrenadante de los cultivos celulares (paneles superiores), y se midió el RNA viral intracelular por RT-PCR cuantitativa (paneles inferiores) (apartados 4.6.3 y 4.12 de Materiales y Métodos). La línea discontinua paralela al eje de abscisas indica el límite de detección de la infectividad y del RNA viral.



Relación NTP/NDP	Sin nucleósido	Gua 500 μM	Uri 500 μM	Ade 500 μM	Cit 500 μM
ATP/ADP	20,15	6,12	18,41	12,82	16,48
GTP/GDP	2,82	1,67	2,76	2,06	2,65
CTP/CDP	11,00	7,08	16,43	N.C.	15,93
UTP/UDP	1,40	0,70	2,33	0,68	1,74

**Figura 5.2.4.2. Efecto de adenosina, guanosina, citidina y uridina sobre el nivel de nucleótidos intracelulares en células Huh-7.5 reporter.** Paneles superiores: Cantidad intracelular de los 4 nucleósidos-trifosfato tras 72 horas de exposición a los nucleósidos (izquierda). Variación de cada nucleósido-trifosfato respecto al control sin nucleósido (derecha). Paneles inferiores: Misma descripción que la correspondiente a los paneles superiores para la medida de nucleósidos-difosfato. Se realizaron 6 determinaciones por condición. Los resultados de sin nucleósido y Gua 500 μM son los mostrados anteriormente en el apartado 5.2.3. No fue posible determinar el valor de CDP tras el tratamiento con Ade 500 μM por encontrarse por debajo del límite de detección del HPLC. Nótese que la máxima disminución posible es 100%. En el cuadro inferior se indica la relación de concentraciones de trifosfato a difosfato para cada uno de los nucleótidos. Los valores se calcularon dividiendo el promedio de Fmol/célula del nucleósido-trifosfato por el promedio de Fmol/célula del nucleósido-difosfato correspondiente a cada uno de los tratamientos. El ratio CTP/CDP no se pudo determinar para el tratamiento de Ade 500 μM, ya que el valor de CDP en ese caso se encontraba por debajo del límite de detección del HPLC (N.C. es valor no calculable). Los procedimientos se describen en el apartado 4.17 de Materiales y Métodos.

La observación de los datos a nivel global muestran principalmente incrementos de los nucleótidos (tanto dí- como trifosfato) con bases purínicas en respuesta al tratamiento con Ade y Gua e incrementos mayores de los nucleótidos con bases pirimidínicas tras el tratamiento con Uri y Cit. Sin embargo, los incrementos provocados por Gua producen una mayor diferencia entre niveles de nucleótidos con bases purínicas y pirimidínicas en comparación con los generados por Ade. El tratamiento con Gua fue el único que produjo un descenso general de todas las relaciones NTP/NDP, siendo especialmente importante la bajada de 3,3 veces de la relación ATP/ADP, que disminuyó de forma mucho más atenuada tras la exposición a los otros nucleósidos (Fig. 5.2.4.2). Estos resultados refuerzan la idea de que los balances entre nucleótidos con bases purínicas y pirimidínicas y las relaciones NTP/NDP, y no solo la variación en valores absolutos de cada uno de los nucleótidos, pueden ser puntos críticos para que un desbalance de nucleótidos ejerza una acción antiviral.

#### **5.2.5. Complejidad del espectro de mutantes en poblaciones del virus de la hepatitis C pasadas en ausencia o presencia de guanosina.**

Para determinar si el descenso de infectividad producido por Gua está asociado a alguna actividad mutagénica sobre el virus se comparó la complejidad de los espectros de mutantes de poblaciones pasadas en presencia o ausencia de Gua. La región genómica analizada comprende los últimos 49 nucleótidos del gen NS4B y los primeros 490 nucleótidos del gen NS5A. Las poblaciones pasadas tres veces en presencia de Gua experimentaron un aumento significativo de la frecuencia de mutación máxima (de 2,7 veces con 500  $\mu$ M de Gua, y de 1,9 veces con 800  $\mu$ M de Gua) respecto a la población pasada en ausencia de Gua ( $p < 0.0001$  y  $p < 0.01$ ; test  $\chi^2$ ). Sin embargo, los aumentos de frecuencia de mutación mínima y de entropía de Shannon no fueron significativos (Tabla 5.2.5.1).

**Tabla 5.2.5.1. Análisis de las cuasiespecies de poblaciones de HCVp0 pasadas en ausencia o presencia de guanosina<sup>a</sup>.**

[Guanosina] (μM)	Nº de nucleótidos analizados (clones)	Nº de haplotipos <sup>b</sup>	Frec. de mutación mínima <sup>c</sup>	Frec. de mutación máxima <sup>d</sup>	Nº de mutaciones distintas	Nº de mutaciones totales	Entropía de Shannon <sup>e</sup>
0	28208 (53)	21	$8,2 \times 10^{-4}$	$8,9 \times 10^{-4}$	23	25	0,5
500	33339 (64)	34	$1,4 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-3}$	45	79	0,7
800	35606 (68)	30	$9,0 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-3}$	32	59	0,6

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas se corresponden con el pase 3 de las infecciones descritas en la Figura 5.2.3.1. Se analizaron los nucleótidos 6220-6758. La numeración de los residuos del genoma de HCV se corresponde con la del genoma JFH-I (número de acceso #AB047639).

<sup>b</sup> Los haplotipos son el número de secuencias distintas de RNA en la población.

<sup>c</sup> La frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones distintas encontradas (las mutaciones repetidas se cuentan una sola vez) dividido por el número total de nucleótidos secuenciados para cada población. Se han tenido en cuenta todas las mutaciones, incluidas delecciones e inserciones consideradas como mutaciones puntuales (apartado 4.16 de Materiales y Métodos).

<sup>d</sup> La frecuencia de mutación máxima es el número total de mutaciones encontradas dividido por el total de nucleótidos secuenciados en cada población. Se han tenido en cuenta todas las mutaciones incluidas delecciones e inserciones consideradas como mutaciones puntuales (apartado 4.16 de Materiales y Métodos).

<sup>e</sup> La entropía normalizada de Shannon se calcula como  $S_n = -[\sum (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$ , donde  $p_i$  es la frecuencia de cada secuencia en la cuasiespecie y  $N$  es el número de genomas comparados (apartado 4.16 de Materiales y Métodos).

A pesar del aumento en número de mutaciones (Tabla 5.2.5.1), Gua no incrementó la proporción  $[(G \rightarrow A) + (A \rightarrow G)]$  respectó al número total de mutaciones, que son las mutaciones que se esperarían encontrar por incorporación de G en lugar de A debido a un exceso de GTP intracelular (Fig. 5.2.5.1).

	<u>Sin Gua</u>					<u>Gua 500 <math>\mu</math>M</u>					<u>Gua 800 <math>\mu</math>M</u>															
	$\curvearrowright$	U	C	G	A		$\curvearrowright$	U	C	G	A		$\curvearrowright$	U	C	G	A									
U			2	0	1	U			6	2	0	U			5	2	0									
C		2			1	3	C		2			0	0	C		3			1	0						
G		0	0			5	G		2	0			11	G		0	3			3						
A		1	0	8			A		4	1	5			A		1	0	9								
$\frac{[(G \rightarrow A) + (A \rightarrow G)]}{[\text{Mutaciones Totales}]}$							$0.57$							$0.48$							$0.44$					

**Figura 5.2.5.1. Matrices de tipos de mutaciones en el espectro de mutantes de poblaciones de HCV que han sido pasadas en ausencia o presencia de guanosina.** Las mutaciones (de los nucleótidos escritos verticalmente a los escritos horizontalmente) se contabilizan en los clones individuales analizados en cada población respecto a su secuencia consenso (que no varía respecto a la del aislado JFH-I). La relación  $[(G \rightarrow A) + (A \rightarrow G)] / \text{Mutaciones totales}$  está indicada en el recuadro debajo de cada matriz. Las poblaciones analizadas son las del pase 3 de las infecciones descritas en la Figura 5.2.3.1.



El cambio más notable fue que la replicación en presencia de Gua aumentó significativamente el número de deleciones e inserciones en el espectro de mutantes. Se observaron 10 deleciones y 2 inserciones distintas en la población tratada con Gua 500  $\mu\text{M}$  y 5 deleciones distintas en la población tratada con 800  $\mu\text{M}$  de Gua, mientras que no se observó ninguna delección o inserción en la población pasada en paralelo en ausencia de Gua (Tabla 5.2.5.2). Este incremento es inusual, ya que de todas las poblaciones cuyos espectros de mutantes han sido analizados en esta Tesis Doctoral (apartados 5.1 y 5.2) solo en un clon se observó una delección de dos nucleótidos en el gen E2 (Figura 5.1.4.1 y Tabla 5.1.4.2). En la población tratada con Gua 500  $\mu\text{M}$  se analizaron 64 clones, de los cuales 11 presentaron deleciones y 2 inserciones. En la población tratada con Gua 800  $\mu\text{M}$  se analizaron 68 clones de los cuales 20 presentaron alguna delección. El porcentaje de clones con una o más deleciones es del 17% y 29% en las poblaciones tratadas con 500  $\mu\text{M}$  y 800  $\mu\text{M}$  de Gua, respectivamente, y de 0% en la población control. Estas diferencias son estadísticamente significativas ( $p < 0.01$  y  $p < 0.0001$ ; test  $\chi^2$ ). Solamente se observaron inserciones en la población pasada en presencia de Gua 500  $\mu\text{M}$ . Ello corresponde al 3% de las secuencias analizadas, lo que no representa una diferencia significativa respecto a la población control. Ninguna de las deleciones e inserciones encontradas se encontraban en fase y todas generaron un codón de STOP prematuro.

Las mutaciones observadas (puntuales, deleciones e inserciones), las sustituciones de aminoácido y su probabilidad según la matriz de sustitución PAM 250 (Feng et al, 1978) se enumeran en la Tabla 5.2.5.2 y en las Figuras 5.2.5.2, 5.2.5.3 y 5.2.5.4.

La conclusión de estos análisis es que el exceso de Gua presente en el medio de cultivo durante la replicación de HCV modifica las concentraciones absolutas y relativas de NTPs y NDPs intracelulares y aumenta la frecuencia de mutación del virus, con un aumento notable de la frecuencia de las deleciones. No sabemos si existe alguna relación entre las alteraciones en los niveles de nucleótidos y el incremento de mutaciones, uno de los puntos que estamos investigando en este momento. Aunque podría esperarse que el nivel de deleciones e inserciones fuese mayor en presencia de Gua 800  $\mu\text{M}$  que Gua 500  $\mu\text{M}$ , el resultado obtenido fue el contrario (comparar figuras 5.2.5.2, 5.2.5.3 y 5.2.5.4). La dinámica de cuasiespecies, con eliminación de los genomas con menor *fitness* (por presencia de deleciones) podría explicar esta aparente discrepancia observada a nivel mutacional con poblaciones de FMDV fuertemente mutagénizadas por R (Perales et al, 2011) (apartado 6.2 de Discusión).

**Tabla 5.2.5.2. Mutaciones, cambio de aminoácido y su probabilidad (PAM250) en los espectros de mutantes de la región genómica comprendida entre el nucleótido 6220 al 6758.**

HCV p3 Sin Gua <sup>a</sup>			HCV p3 Gua 500 $\mu$ M <sup>a</sup>			HCV p3 Gua 800 $\mu$ M <sup>a</sup>		
Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido	PAM 250
A6220U <sup>c</sup>	-	-	A6220Del <sup>c</sup>	- 1 nt	-	A6220U <sup>c</sup>	-	-
C6221G <sup>c</sup>	L246V	2	G6225Ins <sup>c</sup>	+ 1 nt	-	A6220Del <sup>c</sup>	- 1 nt	-
G6240A <sup>c</sup>	W252TOP	-8	G6248U <sup>c</sup>	E255L	-3	U6231Del <sup>c</sup>	- 1 nt	-
A6319G	-	-	A6249U <sup>c</sup>	E255L	-3	A6265G <sup>c</sup>	-	-
U6418C	-	-	G6272A	G2R	-3	G6273A	G2E	0
C6454U	-	-	Del 6278-6287	- 10 nt	-	A6319G	-	-
A6464G	N66D	2	G6279A	W4STOP	-8	U6323G	F19V	-1
C6472A	-	-	Del 6289-6292	- 4 nt	-	A6328G	-	-
A6501G	K78R	3	Del 6294-6296	- 3 nt	-	C6364U	-	-
A6558G	Q97R	1	Del 6298-6300	- 3 nt	-	U6382C	-	-
G6559A	-	-	A6301Ins	+ 1 nt	-	G6414A	G49D	1
A6570G	K101R	3	U6312C	I15T	0	A6422G	I52V	4
A6571G	-	-	U6332C	W22R	-2	C6459G	S64C	0
A6578G	T104A	1	G6334A	W22STOP	-8	A6502G	-	-
G6600A	W111STOP	-8	G6365A	G33S	1	A6522G	Q85R	1
C6609A	A114E	0	G6406A	-	-	A6536G	I90V	4
C6612U	A115V	0	G6413A	G49S	1	U6542C	C92R	-4
C6633A	T122K	0	A6452C	N62H	2	G6559C	Q97H	-3
G6637A	-	-	A6452G	N62D	2	C6564U	A99V	0
G6642A	G125E	0	G6470A	G68R	-3	G6611C	A115P	1
U6647C	Y127H	0	C6517U	-	-	G6634A	-	-
A6654G	Y129C	0	G6555A	G95D	1	G6641C	G125R	-3
U6714A	F149Y	7	G6559A	-	-	U6644G	S126A	1
			A6582U	N105I	-2	U6647C	Y127H	0
			A6585G	Y106C	0	A6684G	K139R	3
			A6587G	K107E	0	A6686G	I140V	4
			G6637A	-	-	G6748Del	- 1 nt	-
			G6646U	-	-	U6749Del	- 1 nt	-
			U6647G	Y127D	-4	U6714C	F149S	-3
			U6647C	Y127H	0	U6735C	V156A	0
			Del 6659-6704	- 46 nts	-	C6753U	A162V	0
			C6669U	T134I	0	C6757Del	- 1 nt	-
			U6679C	-	-			
			A6686G	I140V	4			
			A6696U	Q143L	-2			
			U6703G	-	-			
			U6706C	-	-			
			A6709G	-	-			
			U6719C	S151P	1			
			G6727A	-	-			
			A6744Del	- 1 nt	-			
			U6751Del	- 1 nt	-			
			Del 6753-6756	- 4 nt	-			
			A6755U	-	-			
			C6757Del	- 1 nt	-			
<b>Mutaciones distintas</b>			<b>Mutaciones distintas</b>			<b>Mutaciones distintas</b>		
<b>23</b>			<b>45</b>			<b>32</b>		
<b>Sinónimas (%)<sup>d</sup></b>	<b>8 (38)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>d</sup></b>	<b>11 (35)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>d</sup></b>	<b>8 (30)</b>	
<b>No Sinónimas (%)<sup>d</sup></b>	<b>13 (62)</b>		<b>No Sinónimas (%)<sup>d</sup></b>	<b>20 (65)</b>		<b>No Sinónimas (%)<sup>d</sup></b>	<b>19 (70)</b>	
<b>STOP</b>	<b>2</b>		<b>STOP</b>	<b>2</b>		<b>STOP</b>	<b>-</b>	
<b>Deleciones</b>	<b>-</b>		<b>Deleciones</b>	<b>10</b>		<b>Deleciones</b>	<b>5</b>	
<b>Inserciones</b>	<b>-</b>		<b>Inserciones</b>	<b>2</b>		<b>Inserciones</b>	<b>-</b>	

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas corresponden al pase 3 de las infecciones descritas en la Figura 5.2.3.1.

<sup>b</sup> La numeración de los residuos es la del genoma JFH-I (número de acceso #AB047639). Los aminoácidos se representan según el código de una letra (explicado en Abreviaturas) y se numeran desde el aminoácido N-terminal al C-terminal.

<sup>c</sup> Este superíndice indica las mutaciones en el gen NS4B, el resto de ellas se encuentra en el gen NS5A.

<sup>d</sup> El porcentaje de mutaciones sinónimas y no sinónimas se calculó sin tener en cuenta delecciones, inserciones y cambios a codón de STOP.

En naranja se representan las delecciones y en azul las inserciones.

---

Deleciones en HCVp3 Gua 500 µM										
JFH-1	ACU T 241	AUA I 242	ACC T 243	AGC S 244	CU <sup>6220</sup> L 245	CUC L 246	AGA R 247	AGA R 248	CUC L 249	NS4B <sup>a</sup> STOP, 6243 nt <sup>b</sup> 2 <sup>c</sup>
Delección 1	ACU	AUA	ACC	AGC	CU	Δ(6220) (1 nt)	CUC	AGA	AGA	CUC
JFH-1	UCC S 1	GGA G 2	UCC S 3	UGG <sup>6278</sup> W 4	..... ...	G <sup>6287</sup> AC D 7	GUG V 8	UGG W 9	GAC D 10	NS5A <sup>a</sup> STOP, 6315 nt <sup>b</sup> 4 <sup>c</sup>
Delección 2	UCC	GGA	UCC	Δ(6278-6287) (10 nt)		AC	GUG	UGG	GAC	
JFH-1	UCC S 3	UGG W 4	CUC L 5	CGC R 6	GA <sup>6289</sup> D 7	GUG <sup>6292</sup> V 8	UGG W 9	GAC D 10	UGG W 11	NS5A <sup>a</sup> STOP, 6315 nt <sup>b</sup> 4 <sup>c</sup>
Delección 3	UCC	UGG	CUC	CGC	GA	Δ(6289-6292) (4 nt)	UGG	GAC	UGG	
JFH-1	CUC L 5	CGC R 6	GAC D 7	GUG V 8	U <sup>6294</sup> GG W 9	G <sup>6296</sup> AC D 10	UGG W 11	GUU V 12	UGC C 13	NS5A <sup>a</sup> STOP, 6315 nt <sup>b</sup> 4 <sup>c</sup>
Delección 4	CUC	CGC	GAC	GUG	U	Δ(6294-6296) (3 nt)	AC	UGG	GUU	UGC
JFH-1	CGC R 6	GAC D 7	GUG V 8	UGG W 9	GA <sup>6294</sup> D 10	G <sup>6296</sup> G W 11	GUU V 12	UGC C 13	ACC T 14	NS5A <sup>a</sup> STOP, 6315 nt <sup>b</sup> 4 <sup>c</sup>
Delección 5	CGC	GAC	GUG	UGG	GA	Δ(6298-6300) (3 nt)	G	GUU	UGC	ACC
JFH-1	UCC S 128	UAU Y 129	GUA V 130	ACA <sup>6659</sup> T 131	..... ...	U <sup>6704</sup> CU S 146	CCA P 147	GAG E 148	UUU F 149	NS5A <sup>a</sup> STOP, 6864 nt <sup>b</sup> 1 <sup>c</sup>
Delección 6	UCC	UAU	GUA	Δ(6659-6704) (46 nt)		CU	CCA	GAG	UUU	
JFH-1	GGU G 155	GUG V 156	CAG Q 157	AUC I 158	C <sup>6744</sup> A U H 159	AGG R 160	UUU F 161	GCA A 162	CCC P 163	NS5A <sup>a</sup> STOP, 6864 nt <sup>b</sup> 1 <sup>c</sup>
Delección 7	GGU	GUG	CAG	AUC	C	Δ(6744) (1 nt)	U AGG	UUU	GCA	CCC
JFH-1	CAG Q 157	AUC I 158	CAU H 159	AGG R 160	UU <sup>6751</sup> F 161	GCA A 162	CCC P 163	ACA T 164	CCA P 165	NS5A <sup>a</sup> STOP, 6864 nt <sup>b</sup> 1 <sup>c</sup>
Delección 8	CAG	AUC	CAU	AGG	UU	Δ(6751) (1 nt)	GCA	CCC	ACA	CCA
JFH-1	CAU H 159	AGG R 160	UUU F 161	G <sup>6753</sup> CA A 162	C <sup>6756</sup> C P 163	ACA T 164	CCA P 165	AAG K 166	CCG P 167	NS5A <sup>a</sup> STOP, 6864 nt <sup>b</sup> 1 <sup>c</sup>
Delección 9	CAU	AGG	UUU	G	Δ(6753-6756) (4 nt)	C	ACA	CCA	AAG	CCG
JFH-1	CAU H 159	AGG R 160	UUU F 161	GCA A 162	CC <sup>6757</sup> P 163	ACA T 164	CCA P 165	AAG K 166	CCG P 167	NS5A <sup>a</sup> STOP, 6864 nt <sup>b</sup> 1 <sup>c</sup>
Delección 10	CAU	AGG	UUU	GCA	CC	Δ(6757) (1 nt)	ACA	CCA	AAG	CCG

**Figura 5.2.5.2. Deleciones observadas en el espectro de mutantes de poblaciones pasadas en presencia de 500 µM Gua.** Las poblaciones analizadas corresponden al pase 3 de las replicas A, B y C descritas en la Figura 5.2.3.I. Se detectaron 10 deleciones distintas de 1 a 46 nt. Las deleciones 2, 3, 4 y 5 siempre aparecen de forma conjunta (por ello al sumar entre todas 20 nt se perdió el marco de lectura abierta).

<sup>a</sup> Gen donde se localiza la mutación.

<sup>b</sup> Se indica si se genera un codón de STOP prematuro y su posición.

<sup>c</sup> Número de clones de la población que presentan cada delección.

Inserciones en HCVp3 Gua 500 µM									
JFH-1	AGC	CUA	CUC	AGC	AGA	CUC	CAC		
	S	L	L	R	R	L	H		
	244	245	246	247	248	249	250		
Inserción 1	AGC	CUA	CUC	A	+ G (6225, 1nt)	G	CAG	ACU	CCA
JFH-1	GUG	UGG	GAC	UGG	GUU	UGC	ACC		
	V	W	D	W	V	C	T		
	8	9	10	11	12	13	14		
Inserción 2	GUG	UGG	GAC	UG	+ A (6301, 1nt)	GGU	UUG	CAC	
NS4B <sup>a</sup> STOP, 6246 nt <sup>b</sup> 1 <sup>c</sup>									
NS5A <sup>a</sup> STOP, 6298 nt <sup>b</sup> 1 <sup>c</sup>									

**Figura 5.2.5.3. Inserciones observadas en el espectro de mutantes de poblaciones pasadas en presencia de 500 µM Gua.** Las poblaciones analizadas corresponden al pase 3 de las replicas A, B y C descritas en la Figura 5.2.3.I.

<sup>a</sup> Gen donde se localiza la mutación.

<sup>b</sup> Se indica si se genera un codón de STOP prematuro y su posición.

<sup>c</sup> Número de clones de la población que presentan cada inserción.

Deleciones en HCVp3 Gua 800 µM									
JFH-1	ACU	AUA	ACC	AGC	CU <sup>6220</sup> A	CUC	AGA	AGA	CUC
	T	I	T	S	L	L	R	R	L
	241	242	243	244	245	246	247	248	249
Delección 1	ACU	AUA	ACC	AGC	CU	Δ(6220) (1 nt)	CUC	AGA	AGA
JFH-1	CUA	CUC	AGA	AGA	C <sup>6231</sup> U C	CAC	AAU	UGG	AUA
	L	L	R	R	L	H	N	W	I
	245	246	247	248	249	250	251	252	253
Delección 2	CUA	CUC	AGA	AGA	C	Δ(6231) (1 nt)	C CAC	AAU	UGG
JFH-1	GUG	CAG	AUC	CAU	AG <sup>6748</sup> G	UUU	GCA	CCC	ACA
	V	Q	I	H	R	F	A	P	T
	156	157	158	159	160	161	162	163	164
Delección 3	GUG	CAG	AUC	CAU	AG	Δ(6748) (1 nt)	UUU	GCA	CCC
JFH-1	CAG	AUC	CAU	AGG	U <sup>6749</sup> U	GCA	CCC	ACA	CCA
	Q	I	H	R	F	A	P	T	P
	157	158	159	160	161	162	163	164	165
Delección 4	CAG	AUC	CAU	AGG	U	Δ(6749) (1 nt)	UU	GCA	CCC
JFH-1	CAU	AGG	UUU	GCA	CC <sup>6757</sup> C	ACA	CCA	AAG	CCG
	H	R	F	A	P	T	P	K	P
	159	160	161	162	163	164	165	166	167
Delección 5	CAU	AGG	UUU	GCA	CC	Δ(6757) (1 nt)	ACA	CCA	AAG
NS4B <sup>a</sup> STOP, 6243 nt <sup>b</sup> 13 <sup>c</sup>									
NS4B <sup>a</sup> STOP, 6243 nt <sup>b</sup> 1 <sup>c</sup>									
NS5A <sup>a</sup> STOP, 6864 nt <sup>b</sup> 3 <sup>c</sup>									
NS5A <sup>a</sup> STOP, 6864 nt <sup>b</sup> 1 <sup>c</sup>									
NS5A <sup>a</sup> STOP, 6864 nt <sup>b</sup> 2 <sup>c</sup>									

**Figura 5.2.5.4. Deleciones observadas en el espectro de mutantes de poblaciones pasadas en presencia de 800 µM Gua.** Las poblaciones analizadas corresponden al pase 3 de las replicas A, B y C descritas en la Figura 5.2.3.I.

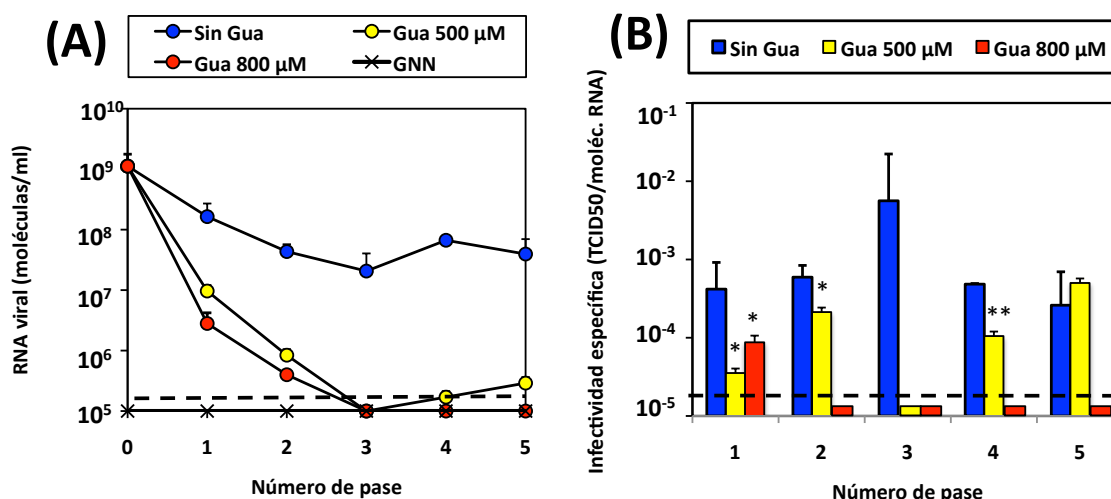
<sup>a</sup> Gen donde se localiza la mutación.

<sup>b</sup> Se indica si se genera un codón de STOP prematuro y su posición.

<sup>c</sup> Número de clones de la población que presentan cada delección.

### 5.2.6. Efecto de la guanosina sobre la infectividad específica y la secuencia consenso del genoma del virus de la hepatitis C.

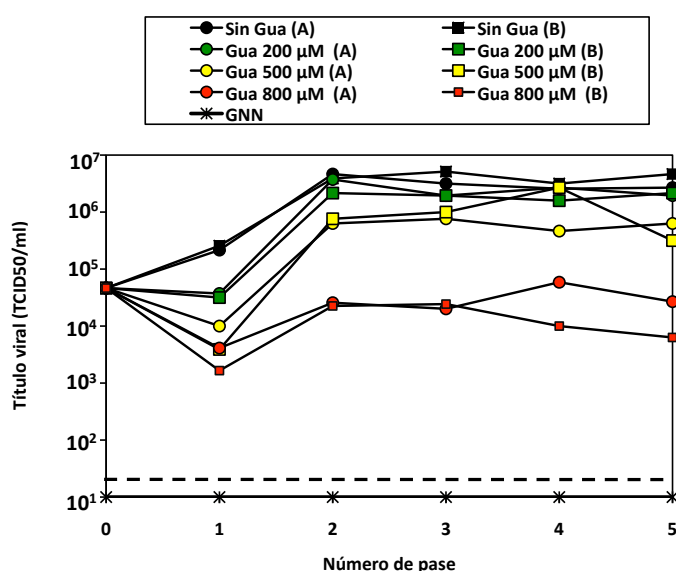
La extinción mediada por mutagénesis letal en virus se caracteriza por disminuciones de la infectividad específica (la infectividad dividida por la cantidad de RNA viral extracelular) mientras se mantiene invariable la secuencia consenso (Crotty et al, 2001; González-López et al, 2005; Grande-Pérez et al, 2005a; Grande-Pérez et al, 2005b; Ortega-Prieto et al, 2013). Para investigar si la acción anti-HCV de Gua mostraba características de mutagénesis letal, se comparó la infectividad específica de HCV pasado en ausencia y presencia de Gua. La infectividad específica del virus pasado en presencia de Gua 800  $\mu$ M disminuyó hasta valores no medibles a partir del pase 2. En cambio, en presencia de Gua 500  $\mu$ M, la infectividad específica descendió en los primeros pases pero se recuperó en el pase 5 (Fig 5.2.6). En ambos casos la secuencia consenso de la región comprendida entre los nucleótidos 6220 al 6758 permaneció constante. Por lo tanto, la acción antiviral de HCV mediada por Gua, mostró características típicas de mutagénesis letal (ver apartado 6.2 de Discusión).



**Figura 5.2.6. Efecto de la guanosina en la infectividad específica de HCV.** Se infectaron células Huh-7.5 reporter con HCVp0 a una MOI inicial de 0,05 TCID<sub>50</sub>/célula, en ausencia o presencia de Gua a las concentraciones indicadas en el cuadro superior. Se usó la infección con HCV GNN como control negativo. (A) RNA viral extracelular medido por RT-PCR cuantitativa en diferentes pases. Las poblaciones corresponden a las del experimento descrito en la Figura 5.2.3.1 y los valores en cada pase son el promedio de las réplicas A, B y C; se dan las desviaciones estándar. (B) Infectividades específicas calculadas con los valores de infectividad de las réplicas A, B y C de la Fig. 5.2.3.1 y las concentraciones de RNA indicadas en el panel izquierdo. La línea horizontal discontinua indica el límite de detección del RNA viral y la infectividad específica. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con uno ( $p < 0.05$ ) o dos ( $p < 0.002$ ) asteriscos (t-test). Los procedimientos se describen en los apartados 4.7 y 4.12 de Materiales y Métodos.

### 5.2.7. Efecto de la guanosina sobre una población del virus de la hepatitis C de alto *fitness*.

El virus HCVp100 (HCVp0 pasado 100 veces en células Huh-7.5 reporter) obtenido en nuestro laboratorio (Perales et al, 2013), muestra un *fitness* relativo 2,2 veces superior al de la población parental HCVp0. Dado que en el laboratorio hemos obtenido evidencia de que el *fitness* de HCV puede modificar la respuesta del virus a agentes antivirales (Sheldon et al, 2014), HCVp100 se usó para estudiar la respuesta de un HCV de alto *fitness* a Gua. Para ello, HCVp100 fue sometido a 5 pases seriados en células Huh-7.5 reporter usando una MOI inicial de 0,05 TCID<sub>50</sub>/célula, tanto en ausencia como en presencia de Gua 200, 500 y 800 µM. Se llevaron en paralelo 2 réplicas, A y B para cada una de las condiciones. Los resultados muestran una bajada de infectividad máxima de 15 y 736 veces a lo largo de los pases como resultado del tratamiento con Gua 500 y 800 µM, sin embargo no se observó pérdida de infectividad a lo largo de los 5 pases, por tanto la infectividad se ve comprometida como ocurre también con HCVp0 (Fig 5.2.3.1). Al igual que se observa con otros agentes antivirales, existe una diferencia de sensibilidad a Gua entre ambos virus (Fig. 5.2.7). Las diferencias en producción de progenie a lo largo de los pases entre la población control y las tratadas con Gua (200, 500 y 800 µM) resultaron ser estadísticamente significativas, con valores de  $p < 0,003$  en todos los casos (según ANOVA de dos vías tal como se detalla en el apartado 4.16 de Materiales y Métodos).



**Figura 5.2.7. Efecto de la guanosina sobre la producción de progenie infecciosa de HCVp100.** Se infectaron células Huh-7.5 reporter con HCVp100 a una MOI inicial de 0,05 TCID<sub>50</sub>/célula, en ausencia o presencia de Gua (2 réplicas biológicas por concentración de Gua denominadas A y B). Se llevaron a cabo también infecciones con HCV GNN en paralelo (control negativo). Se usó la progenie de cada infección para los siguientes pases del virus (apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos). Se determinó la infectividad en los sobrenadantes de los cultivos celulares (apartado 4.6.3 de Materiales y Métodos). La línea discontinua paralela al eje de abscisas indica el límite de detección de la infectividad.

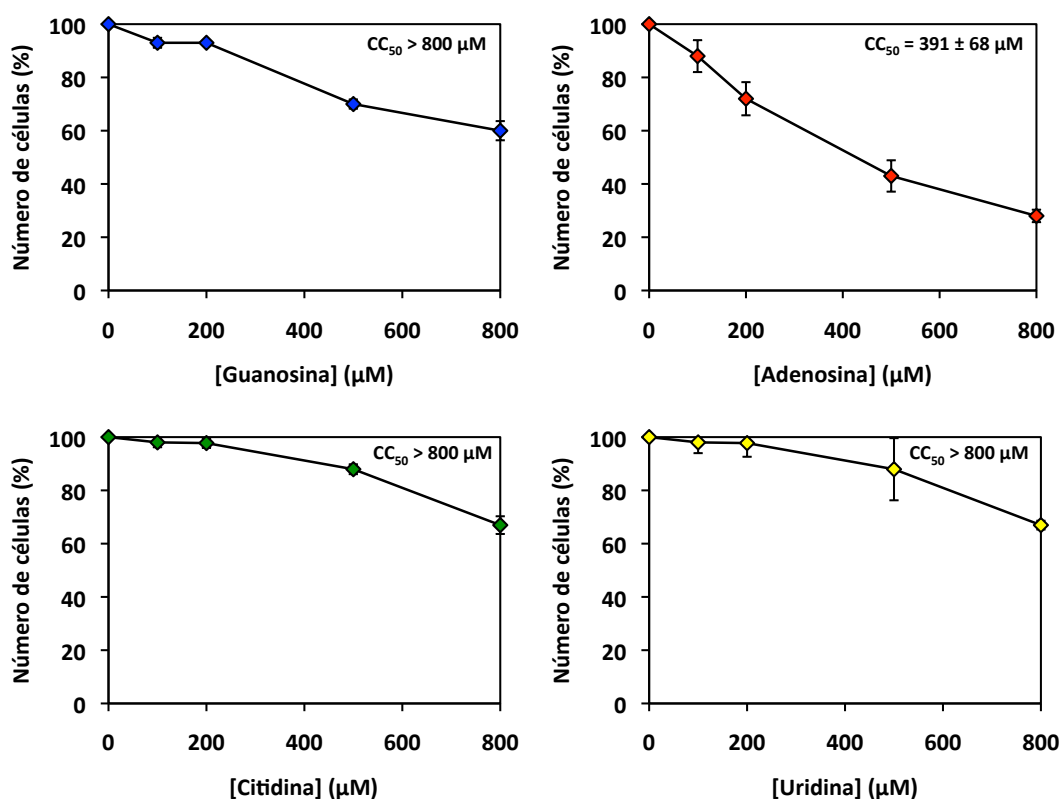
### 5.2.8. Efecto de la guanosina sobre otros virus RNA.

Para determinar la especificidad de la acción antiviral ejercida por Gua sobre HCV y descartar efectos antivirales inespecíficos que podrían afectar a cualquier virus, quizás mediante

mecanismos bioquímicos sobre la célula, se realizaron una serie de experimentos comparativos con otros virus RNA como VSV, FMDV y LCMV.

#### 5.2.8.1. Concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) de los nucleósidos guanosina, adenosina, citidina y uridina para células BHK-21.

Se determinaron los valores de CC<sub>50</sub> de Gua, Ade, Cit y Uri sobre las células BHK-21. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de los nucleósidos (desde 0 a 800 µM) y se determinó la viabilidad de las células 72 horas después del tratamiento. El valor de CC<sub>50</sub> fue de > 800 µM para la Gua, Cit y Uri y de 391 ± 58 µM para la Ade (Fig. 5.2.8.1).



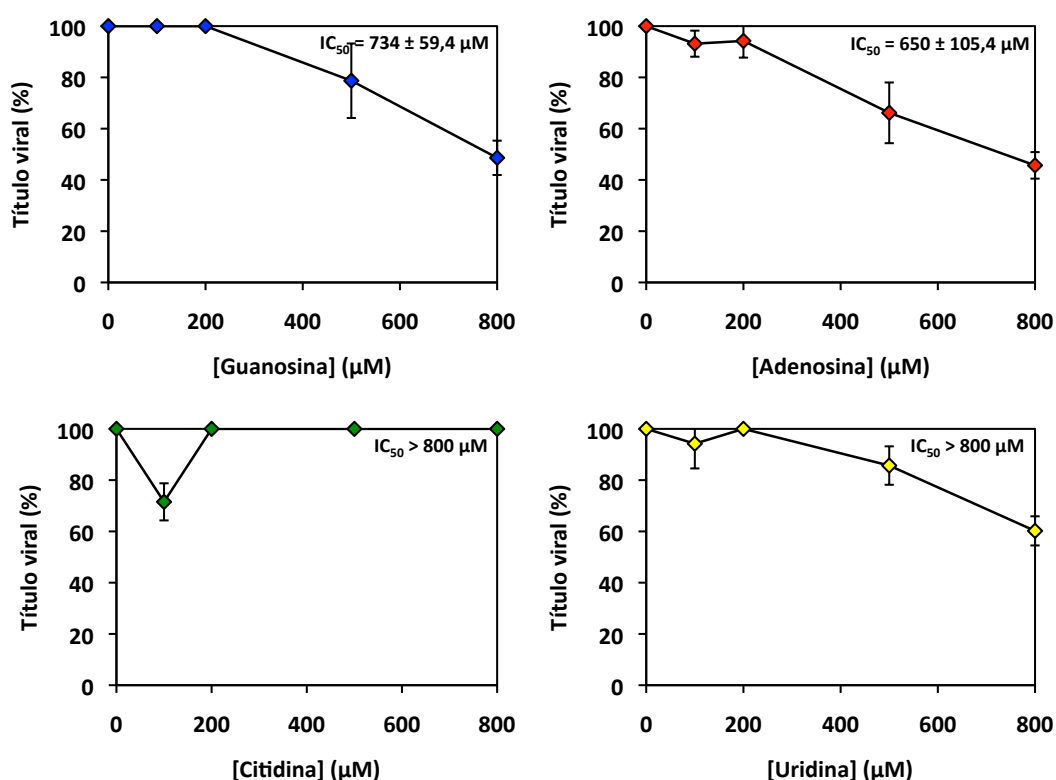
**Figura 5.2.8.1. Cuantificación de la toxicidad para las células BHK-21 de guanosina, adenosina, citidina y uridina.** Las determinaciones de la concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) se llevaron a cabo por triplicado y se dan los valores de las desviaciones estándar. Las condiciones experimentales se describen en el apartado 4.4 de Materiales y Métodos.

#### 5.2.8.2. Concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de guanosina, adenosina, citidina y uridina sobre otros virus RNA.

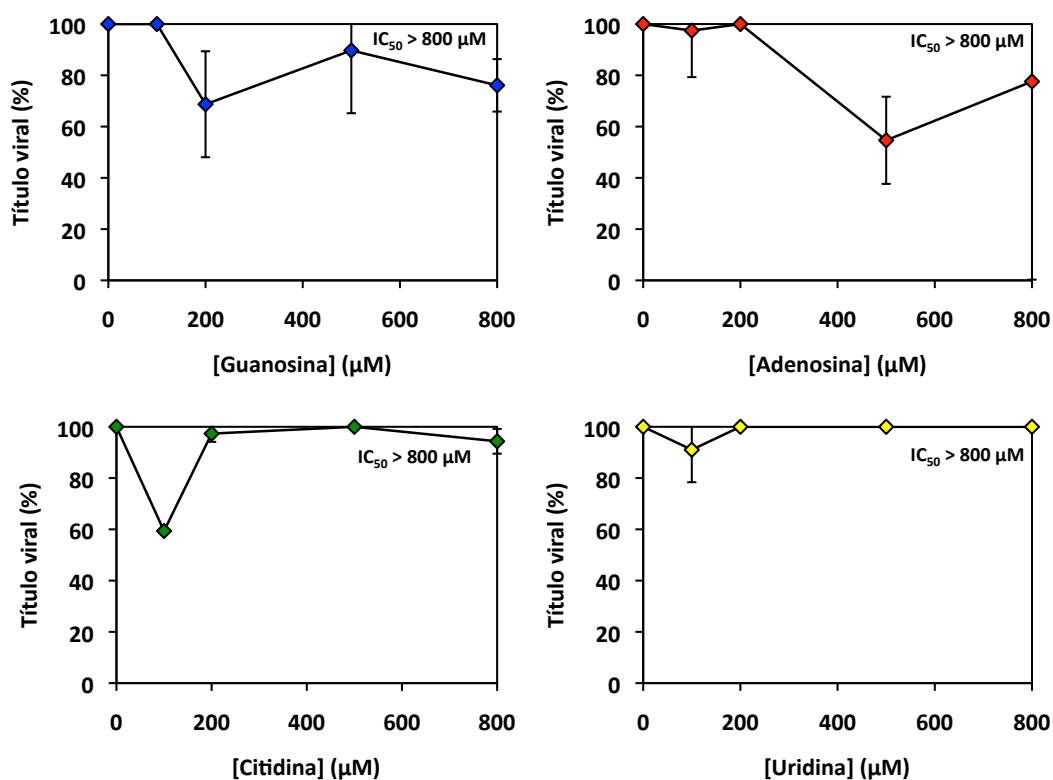
Para determinar los valores de IC<sub>50</sub> de los nucleósidos estándar para otros virus RNA se infectaron células BHK-21 con VSV, FMDV y LCMV a una MOI inicial de 0,05 PFU/célula en presencia de concentraciones crecientes de los nucleósidos y se midió la producción de



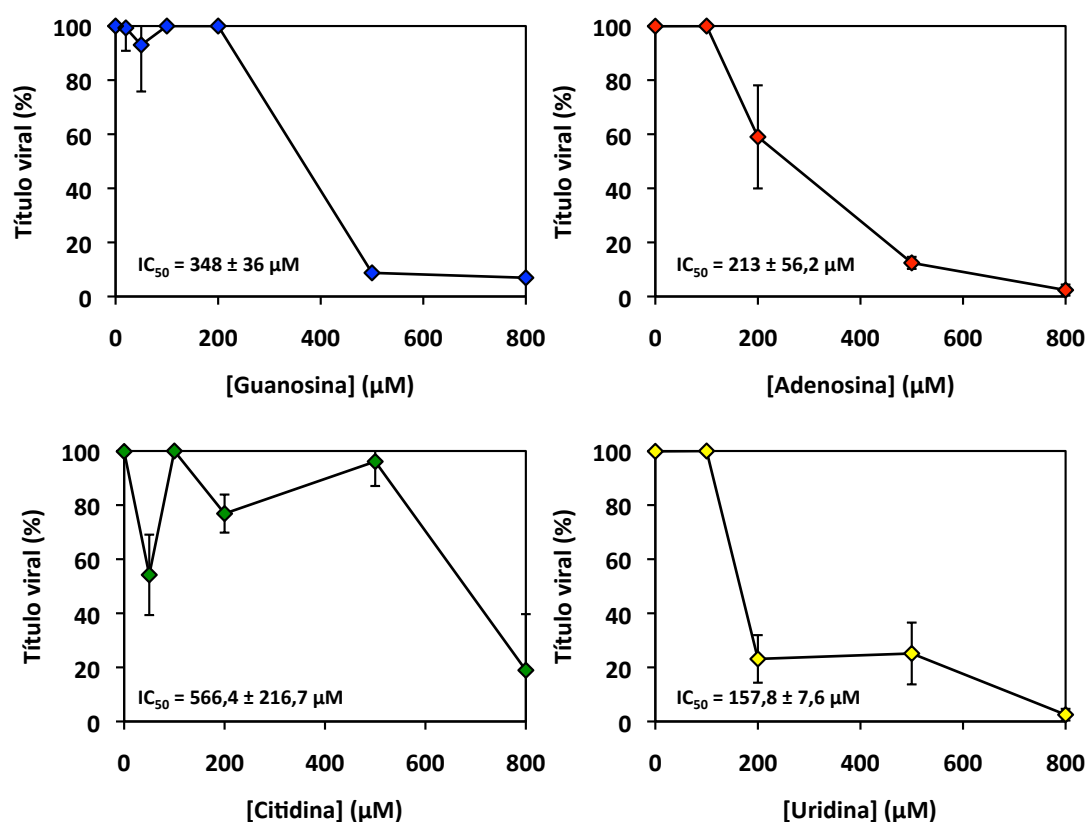
progenie infecciosa. El valor de  $IC_{50}$  de Ade y Gua para VSV fue ( $650 \pm 105,4 \mu M$  y  $734 \pm 59,4 \mu M$ , respectivamente) y  $> 800 \mu M$  para Cit y Uri (Fig. 5.2.8.2.1). Todos los nucleósidos carecieron de carácter inhibitorio para FMDV en las concentraciones utilizadas en el experimento (hasta  $800 \mu M$ ), mientras que para LCMV se pudo calcular un valor de  $IC_{50}$  en todos los casos (Figs. 5.2.8.2.2 y 5.2.8.2.3). Para VSV se observó inhibición por Gua y Ade ( $IC_{50}$  de  $734 \pm 59,4 \mu M$  y  $650 \pm 105,4 \mu M$ , respectivamente) al igual que ocurre para HCV (Fig. 5.2.2)



**Figura 5.2.8.2.1. Cuantificación de la inhibición de la producción de progenie infecciosa de VSV por guanosina, adenosina, citidina y uridina.** Las determinaciones de la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) se llevaron a cabo por triplicado y se dan los valores de desviaciones estándar. Las condiciones experimentales se describen en los apartados 4.5 y 4.6.4 de Materiales y Métodos.



**Figura 5.2.8.2.2. Cuantificación de la inhibición de la producción de progenie infecciosa de FMDV por guanosina, adenosina, citidina y uridina.** Las determinaciones de la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) se llevaron a cabo por triplicado y se dan los valores de desviaciones estándar. Las condiciones experimentales se describen en los apartados 4.5 y 4.6.4 de Materiales y Métodos.



**Figura 5.2.8.2.3. Cuantificación de la inhibición de la producción de progenie infecciosa de LCMV por guanosina, adenosina, citidina y uridina.** Las determinaciones de la concentración inhibitoria 50 ( $\text{IC}_{50}$ ) se llevaron a cabo por triplicado y se dan los valores de desviaciones estándar. Las condiciones experimentales se describen en los apartados 4.5 y 4.6.4 de Materiales y Métodos.

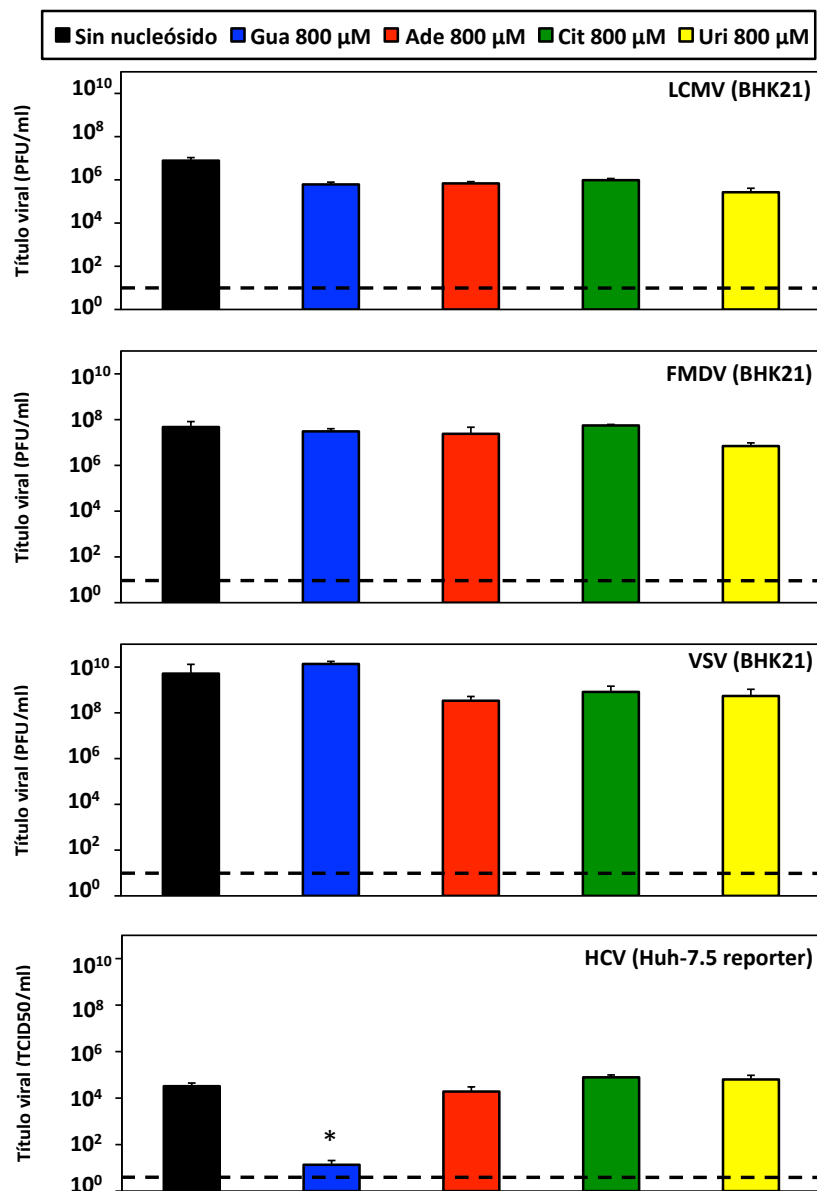
#### **5.2.8.3. Efecto de guanosina, adenosina, citidina y uridina sobre distintos virus RNA a lo largo de pases seriados.**

Como control adicional de la especificidad de la inhibición de HCV por Gua, se estudió la respuesta de otros virus al tratamiento con nucleósidos a lo largo de pases seriados. Este control permite analizar el efecto antiviral de los nucleósidos a largo plazo, ya que la obtención de un valor de  $IC_{50}$  en un solo pase del virus no significa que exista un efecto antiviral sostenido en el tiempo (como se puede observar con la Ade para HCV en las Figuras 5.2.2 y 5.2.4.1). Para ello se infectaron células BHK-21 con VSV, FMDV y LCMV a una MOI inicial de 0,05 PFU/célula y se sometieron a 3 pases tanto en ausencia como en presencia de los nucleósidos a una concentración de 800  $\mu$ M.

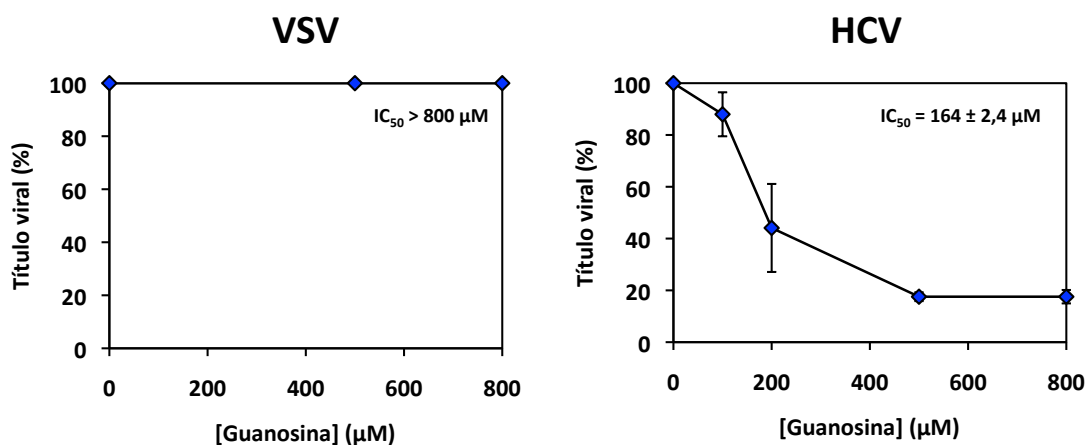
El análisis de la población viral en el pase 3 no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al título obtenido en ausencia de nucleósido. Los resultados se muestran en la Figura 5.2.8.3 y se comparan con los obtenidos con HCV replicando en células Huh-7.5 reporter descritos anteriormente (Fig. 5.2.3.1 y 5.2.4.1). La bajada en el título viral producida por Gua para HCV fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , t-test) (Fig. 5.2.8.3). Los resultados obtenidos en estos experimentos demuestran que la inhibición de la producción de progenie vírica por Gua no es inespecífica.

#### **5.2.8.4. Efecto de la guanosina sobre VSV en células Huh-7.5 reporter.**

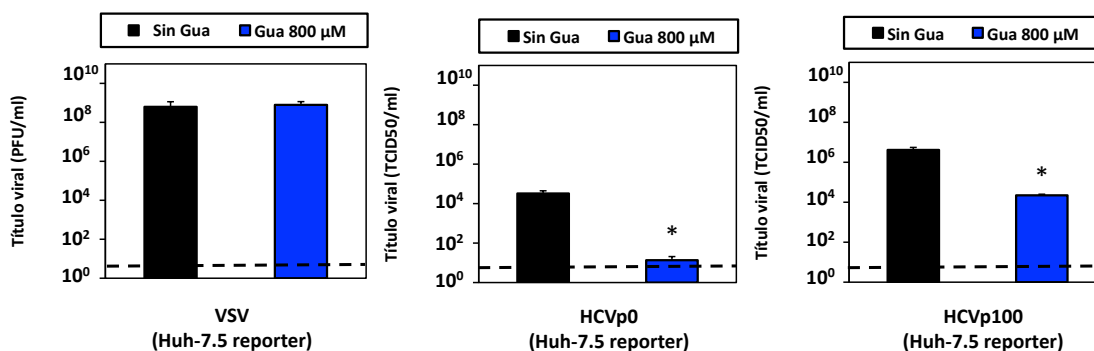
Para descartar que la acción inhibitoria de Gua sobre HCV se debiera exclusivamente a la acción del nucleósido sobre las células de hepatoma humano empleadas en nuestros experimentos se midió la producción de progenie viral de VSV en células Huh-7.5 reporter que también se infectan productivamente. Los resultados muestran que Gua no inhibe la producción de VSV, pero si de HCVp0 y HCVp100 (Figs. 5.2.8.4.1 y 5.2.8.4.2).



**Figura 5.2.8.3. Efecto de la guanosina, adenosina, citidina y uridina sobre la producción de progenie infecciosa de distintos virus RNA.** Se infectaron las células descritas en paréntesis con los virus RNA indicados a una MOI inicial de 0,05 PFU/célula o TCID<sub>50</sub>/célula, en ausencia o presencia de 800  $\mu$ M de los nucleósidos (código de colores en el cuadro superior). Se determinó la infectividad en el sobrenadante de cultivos celulares (apartados 4.6.3 y 4.6.4 de Materiales y Métodos). Los títulos mostrados para HCV son los obtenidos en el pase 3 de los sobrenadantes de las infecciones correspondientes a las Figs. 5.2.3.I (promedio de las 4 réplicas) y 5.2.4.I (una réplica). Se usó la progenie de cada infección para el siguiente pase del virus (apartados 4.6.2 y 4.6.4 de Materiales y Métodos). La diferencia estadísticamente significativa se indica con un asterisco ( $p < 0.05$ ) (t-test). La línea discontinua paralela al eje de abscisas indica el límite de detección de la infectividad.



**Figura 5.2.8.4.1. Cuantificación de la inhibición de la producción de progenie infecciosa de VSV por guanosina.** Las determinaciones de la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) se llevaron a cabo por triplicado y se dan los valores de desviaciones estándar. Las condiciones experimentales se describen en los apartados 4.5 y 4.6.4 de Materiales y Métodos. Como comparación se incluye los datos para HCV correspondientes a la Figura 5.2.2.



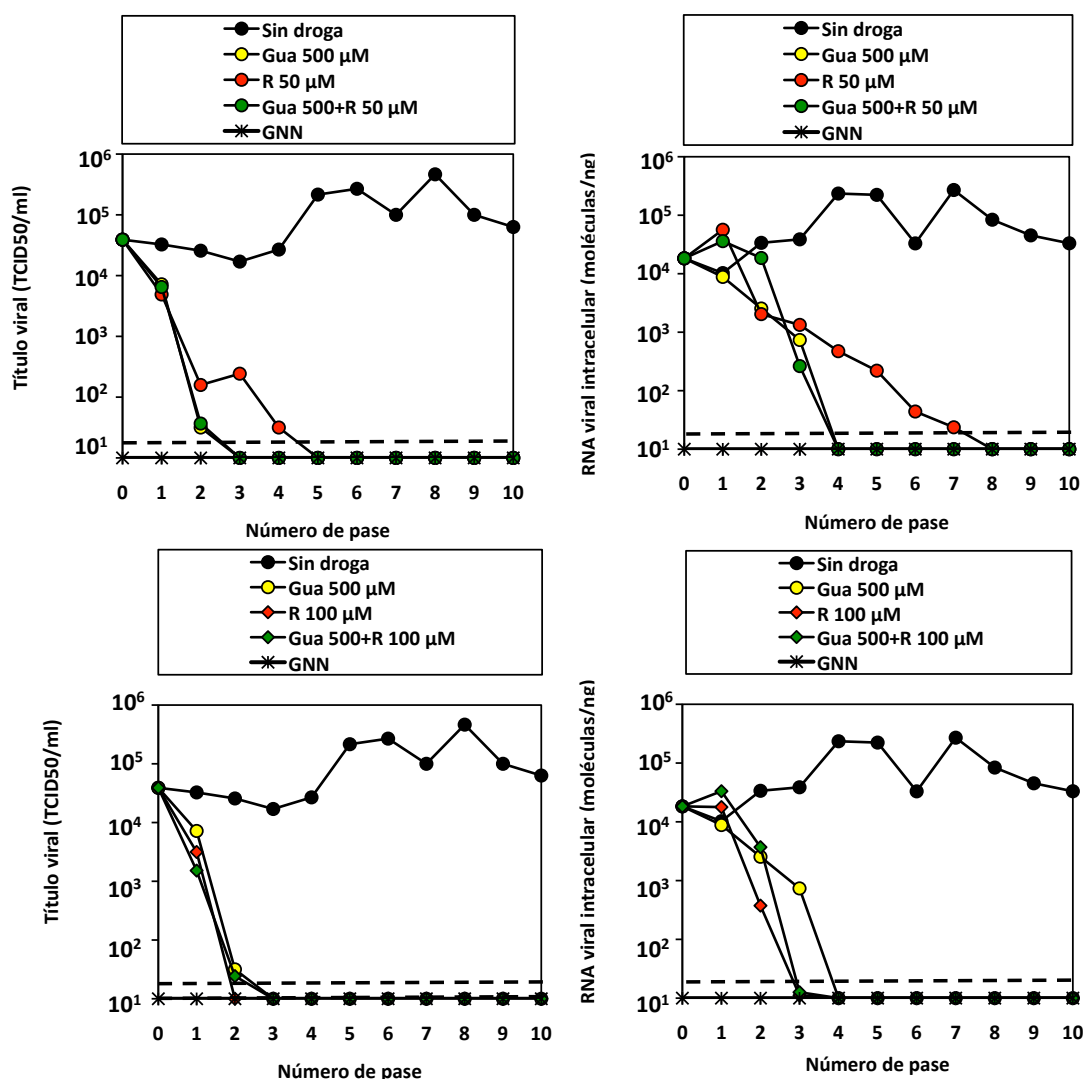
**Figura 5.2.8.4.2 Efecto de la guanosina sobre la producción de progenie infecciosa en células Huh-7.5 reporter.** Se infectaron células Huh-7.5 reporter con VSV a una MOI inicial de 0,05 PFU/célula o con HCVp0 y HCVp100 a una MOI inicial de 0,05 TCID<sub>50</sub>/célula, en ausencia o presencia de 800 µM de Gua. Se usó la progenie de cada infección para el siguiente pase del virus (apartado 4.6.2 y 4.6.4 de Materiales y Métodos). Se determinó la infectividad en el sobrenadante de cultivos celulares en el pase 3 (apartados 4.6.3 y 4.6.4 de Materiales y Métodos). Los resultados de HCV son los mostrados anteriormente en los apartados 5.2.3 y 5.2.6. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con un asterisco ( $p < 0.05$ ) (t-test). La línea discontinua paralela al eje de abscisas indica el límite de detección de la infectividad.

### **5.2.9. Efecto de la ribavirina y la guanosina sobre el virus de la hepatitis C y sobre el nivel de nucleótidos intracelulares en células Huh-7.5 reporter.**

Para investigar el efecto de una alta concentración de Gua sobre niveles de nucleótidos en las condiciones en las que R ejerce una actividad inhibitoria sobre HCV y que es compensada parcialmente por Gua (apartado 5.1.5), HCV fue sometido a 10 pases seriados en células Huh-7.5 reporter en presencia de R (50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) y Gua (500  $\mu$ M), aisladas o en combinación.

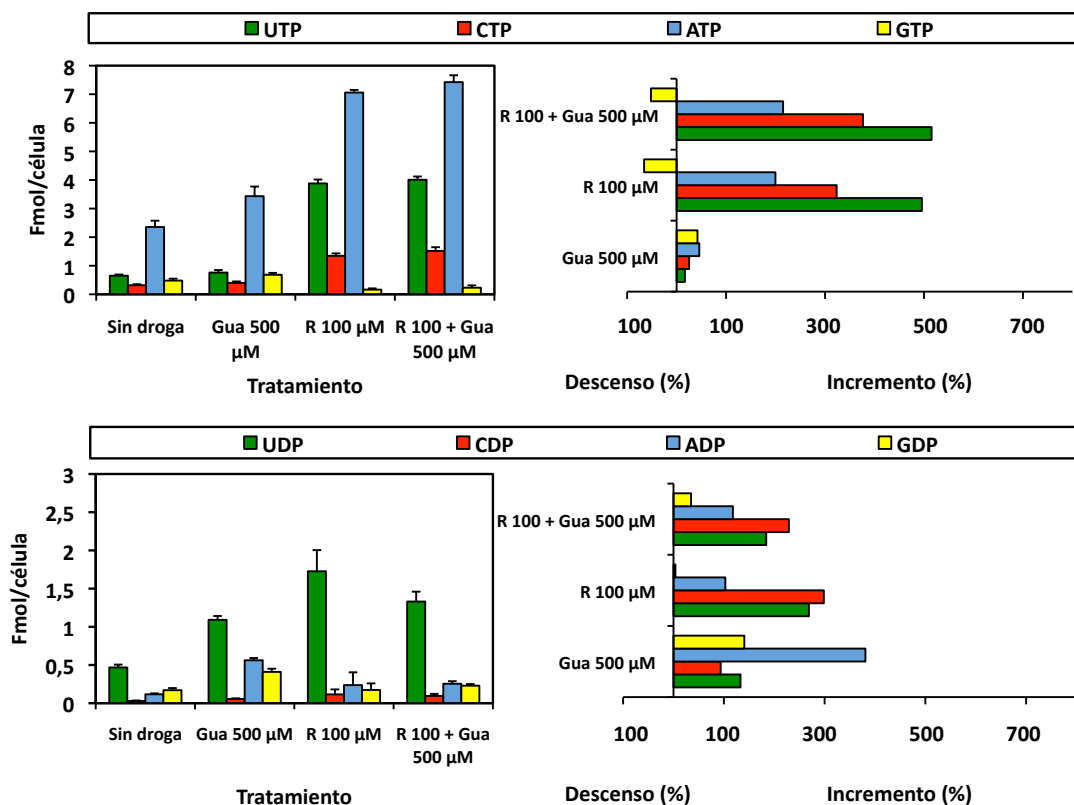
Los resultados muestran una consistente bajada de la infectividad y del RNA viral intracelular de HCV como resultado del tratamiento con Gua, R y R+Gua, acentuado con R 100  $\mu$ M y no compensado por la presencia de Gua 500  $\mu$ M (Fig. 5.2.9.1). Las pérdidas de título y RNA viral intracelular producidas por los tratamiento de combinación (R 50  $\mu$ M + Gua y R 100  $\mu$ M + Gua) tuvieron lugar en los pases 3 y 4, respectivamente. En cambio, en ausencia de Gua las pérdidas se retrasaron a los pases 5 y 8. La disminución de infectividad en el sobrenadante precedió al descenso del nivel de RNA viral intracelular (Fig. 5.2.9.1). Es decir, Gua 500  $\mu$ M no compensa la acción inhibitoria de R, contrariamente a la compensación que ejerce Gua 200  $\mu$ M (apartado 5.1.5).

La Gua añadida al medio de cultivo de las células Huh-7.5 reporter a concentraciones de 500  $\mu$ M y 800  $\mu$ M produce una disminución de la relación NTP/NDP y además provoca un descenso de los nucleótidos con bases pirimidínicas. Ambos hechos podrían tener relación con la actividad inhibitoria de Gua sobre HCV (apartado 5.2.3). Por ello a continuación se determinó el efecto de los tratamientos con Gua y R sobre el nivel intracelular de NTPs y NDPs en células Huh-7.5 reporter tras 72 horas de tratamiento. Los resultados (Fig. 5.2.9.2) mostraron un incremento más acentuado del nivel de NDPs que de NTPs cuando se trató con Gua 500  $\mu$ M, particularmente significativo para ADP. La fuerte disminución de la relación ATP/ADP asociada al tratamiento con Gua se compensó con la adición de R (Fig 5.2.9.2, cuadro inferior). Tanto con R 100  $\mu$ M como con R+Gua se produjo un drástico incremento de ATP, CTP, y UTP, que fue superior al aumento de los correspondientes NDPs y una importante bajada del GTP intracelular. Por otra parte, el tratamiento combinado de R + Gua invirtió los incrementos de tipos de nucleótidos, es decir, favoreció el incremento de nucleótidos con bases pirimidínicas por encima de los de bases purínicas. Gua 500  $\mu$ M por tanto es incapaz de compensar la bajada de GTP y no afecta a la acción antiviral de la R (Fig 5.2.9.2).



**Figura 5.2.9.1. Efecto de la ribavirina y la guanosina sobre la producción de progenie viral infecciosa y RNA viral intracelular de HCV.** Se infectaron células Huh-7.5 reporter con HCVp0 a una MOI inicial de 0.1 TCID<sub>50</sub>/célula, en ausencia o presencia de R y Gua a las concentraciones indicadas. Se llevaron a cabo infecciones en paralelo con HCV GNN (control negativo). Se usó la progenie viral generada en cada infección para los siguientes pases del virus (apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos). Se determinó la infectividad viral en el sobrenadante de los cultivos celulares (paneles de la izquierda) y se midió el RNA viral intracelular por RT-PCR cuantitativa en el extracto de células infectadas (paneles de la derecha) (apartados 4.6.3 y 4.12 de Materiales y Métodos). Los resultados de HCV sin droga, R 50 y R100  $\mu$ M son los mostrados anteriormente en el apartado 5.1.5.1. Las líneas discontinuas paralelas al eje de abscisas indican los límites de detección de la infectividad y del RNA viral.





Relación NTP/NDP	Sin Droga	Gua 500 μM	R 100 μM	R 100 μM + Gua 500 μM
ATP/ADP	20,15	6,12	29,77	29,15
GTP/GDP	2,82	1,67	0,95	1,01
CTP/CDP	11,00	7,08	11,63	15,85
UTP/UDP	1,40	0,70	2,25	3,01

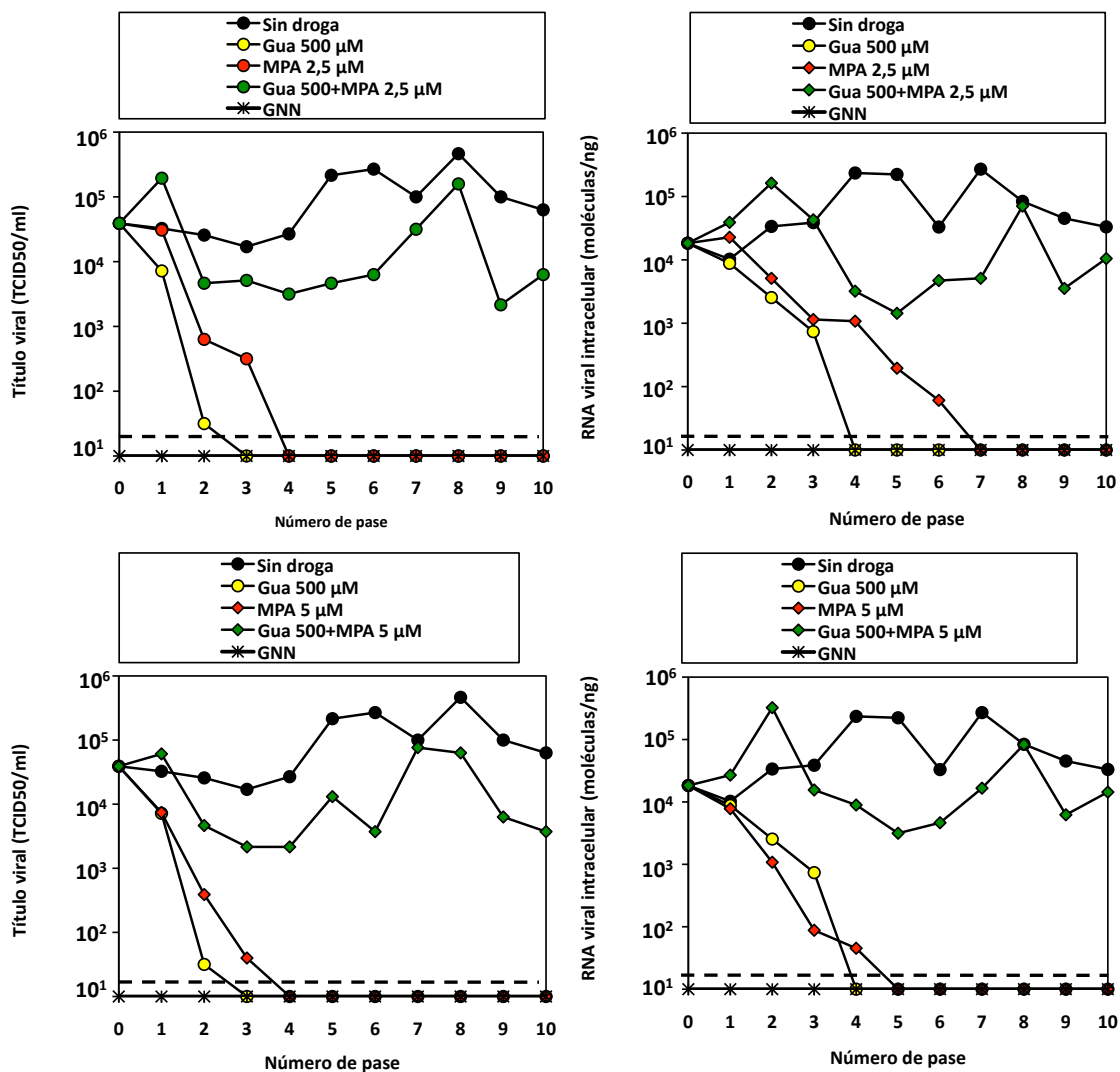
**Figura 5.2.9.2. Efecto de la ribavirina y la guanosina sobre el nivel de nucleótidos intracelular en células Huh-7.5 reporter.** Paneles superiores: Cantidad intracelular de los 4 nucleósidos-trifosfato tras 72 horas de exposición a los distintos tratamientos (izquierda). Variación de cada nucleósido-trifosfato respecto al control sin R o Gua (derecha). Paneles inferiores: Misma descripción que la correspondiente a los paneles superiores para la medida de nucleósidos-difosfato. Se realizaron 6 determinaciones por condición. Los resultados de sin droga y Gua 500 μM son los mostrados anteriormente en el apartado 5.2.3 y 5.2.4. Nótese que la máxima disminución posible es 100%. En el cuadro inferior se indica la relación de concentraciones de trifosfato a difosfato para cada uno de los nucleótidos, los valores se calcularon dividiendo el promedio de Fmol/célula del nucleósido-trifosfato por el promedio de Fmol/célula del nucleósido-difosfato correspondiente a cada uno de los tratamientos. Los procedimientos se describen en el apartado 4.17 de Materiales y Métodos.

#### **5.2.10. Efecto del ácido micofenólico y la guanosina sobre el virus de la hepatitis C y sobre el nivel de nucleótidos intracelulares en células Huh-7.5 reporter.**

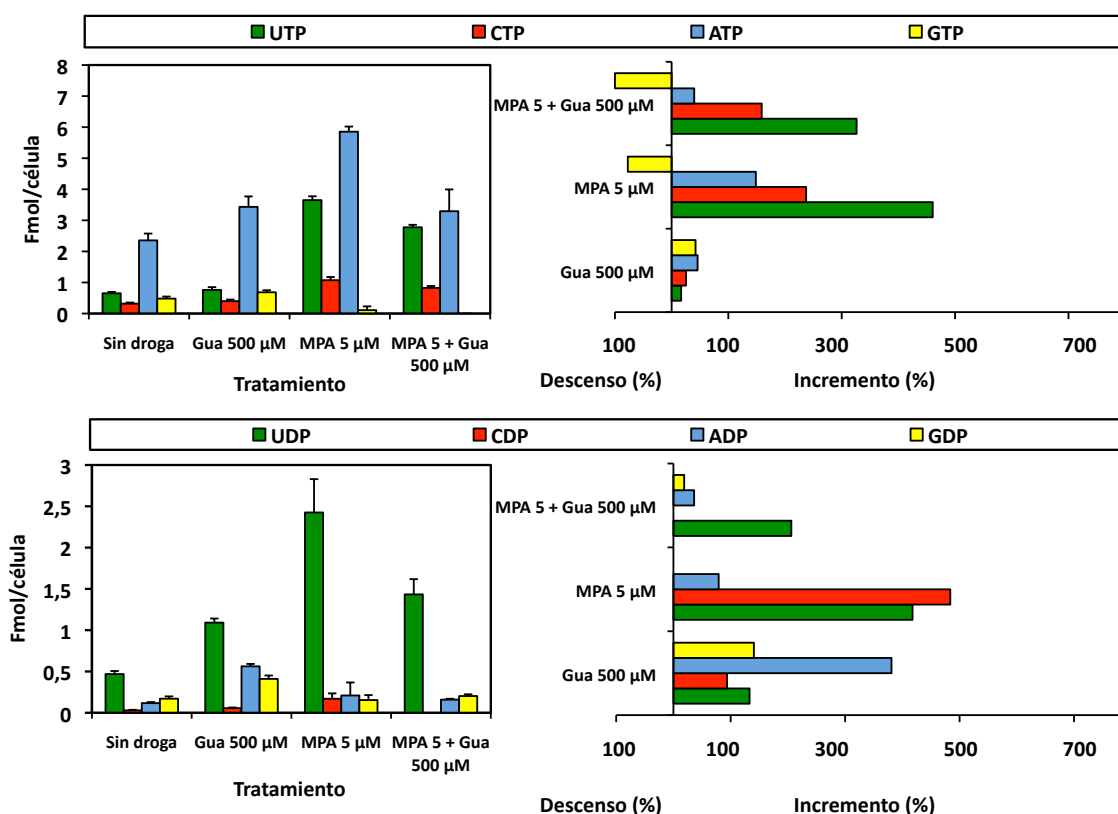
El MPA es un inhibidor competitivo de la IMPDH y, por tanto, disminuye el nivel intracelular de GTP. Para estudiar el efecto del MPA sobre la producción de HCV y una posible actividad compensatoria de una concentración alta de Gua, HCVp0 fue sometido a 10 pases seriados en células Huh-7.5 reporter en presencia de MPA (2,5 y 5  $\mu\text{M}$ ) y Gua (500  $\mu\text{M}$ ), aislados o en combinación. Los resultados muestran una consistente bajada de la producción de progenie viral y del RNA viral intracelular como resultado del tratamiento con Gua y MPA. Sin embargo, la inhibición que producen el MPA o la Gua por separado se anuló cuando el virus replicó en presencia de ambas (Fig. 5.2.10.1). Este resultado contrasta con el obtenido para R y Gua, cuya combinación es tan inhibitoria como R y Gua administradas separadamente (compárense las Figs. 5.2.9.1 y 5.2.10.1). Ni el título viral ni el RNA viral intracelular llegaron a igualarse con los de los pases control. El resultado obtenido para las dos concentraciones de MPA utilizadas fue similar, aunque el descenso del nivel de RNA fue más rápido para MPA 5  $\mu\text{M}$  que para MPA 2,5  $\mu\text{M}$ . (Figura 5.2.10.1).

Se determinó el efecto de los tratamientos con MPA y Gua sobre el nivel intracelular de NTPs y NDPs en células Huh-7.5 reporter tras 72 horas de tratamiento. Cuando se trató con MPA 5  $\mu\text{M}$  y MPA+Gua se produjo un incremento de ATP, CTP, y UTP, y una importante bajada del GTP intracelular, indicando que Gua 500  $\mu\text{M}$  es incapaz de compensar la bajada de GTP producida por el MPA (Fig 5.2.10.2). El nivel de NDPs sufrió un incremento cuando se trató con MPA 5  $\mu\text{M}$  o Gua 500  $\mu\text{M}$ , separadamente. El aumento fue más acentuado para ADP con el tratamiento con Gua y para CDP y UDP con el tratamiento con MPA. Los aumentos de ADP y CDP no se observaron con el tratamiento combinado MPA + Gua. Ello queda reflejado en las relaciones entre las concentraciones de NTPs y NDPs (Fig 5.2.10.2). En resumen, de forma contraria a lo que ocurre con Gua 500  $\mu\text{M}$ , el tratamiento con MPA 5  $\mu\text{M}$  incrementó la relación ATP/ADP aproximadamente 1,4 veces y el tratamiento con ambas drogas igualó los valores con los de las células control. Además, el tratamiento combinado anuló el incremento de nucleótidos con bases purínicas por encima de los de bases pirimidínicas, principalmente observable en los NDPs. Ambas observaciones sugieren que la relación ATP/ADP y la de nucleótidos con bases purínicas y pirimidínicas pueden jugar un papel clave en la inhibición del HCV por la Gua (Fig. 5.2.10.2).

Los posibles mecanismos a través de los cuales la Gua puede ejercer su acción antiviral sobre HCV se desarrollarán a lo largo del apartado 6.2 de Discusión.



**Figura 5.2.10.1. Efecto del ácido micofenólico y la guanosina sobre la producción de progenie viral infecciosa y RNA viral intracelular de HCV.** Se infectaron células Huh-7.5 reporter con HCVp0 a una MOI inicial de 0.1 TCID<sub>50</sub>/célula, en ausencia o presencia de MPA y Gua a las concentraciones indicadas. Se llevaron a cabo infecciones en paralelo con HCV GNN (control negativo). Se usó la progenie viral generada en cada infección para los siguientes pases del virus (apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos). Se determinó la infectividad viral en el sobrenadante de los cultivos celulares (paneles de la izquierda) y se midió el RNA viral intracelular por RT-PCR cuantitativa en el extracto de células infectadas (paneles de la derecha) (apartados 4.6.3 y 4.12 de Materiales y Métodos). Los resultados de HCV sin droga, Gua 500, R 50 y R100  $\mu$ M son los mostrados anteriormente en los apartados 5.1.5.1 y 5.2.9.1. Las líneas discontinuas paralelas al eje de abscisas indican los límites de detección de la infectividad y del RNA viral.



Relación NTP/NDP	Sin Droga	Gua 500 µM	MPA 5 µM	MPA5 µM + Gua 500 µM
ATP/ADP	20,15	6,12	27,97	20,70
GTP/GDP	2,82	1,67	0,71	N.C.
CTP/CDP	11,00	7,08	6,32	N.C.
UTP/UDP	1,40	0,70	1,51	1,94

**Figura 5.2.10.2. Efecto del ácido micofenólico y la guanosina sobre el nivel de nucleótidos intracelular en células Huh-7.5 reporter.** Paneles superiores: Cantidad intracelular de los 4 nucleósidos-trifosfato tras 72 horas de exposición a los distintos tratamientos (izquierda). Variación de cada nucleósido-trifosfato respecto al control sin MPA o Gua (derecha). Paneles inferiores: Mismo descripción que la correspondiente a los paneles superiores para la medida de nucleósidos-difosfato. Los resultados de sin droga y Gua 500 µM son los mostrados anteriormente en el apartado 5.2.3 y 5.2.4. No fue posible determinar los valores de CDP y GTP tras el tratamiento con MPA y Gua por encontrarse ambos por debajo del límite de detección del HPLC. Se realizaron 6 determinaciones por condición. Nótese que la máxima disminución posible es 100%. En el cuadro inferior se indica la relación de concentraciones de trifosfato a difosfato para cada uno de los nucleótidos. Los valores se calcularon dividiendo el promedio de Fmol/célula del nucleósido-trifosfato por el promedio de Fmol/célula del nucleósido-difosfato correspondiente a cada uno de los tratamientos. Los ratios CTP/CDP y GTP/GDP no se pudieron determinar para el tratamiento de MPA y Gua por encontrarse los valores de CDP y GTP por debajo del límite de detección del HPLC (N.C. es valor no calculable). Los procedimientos se describen en el apartado 4.17 de Materiales y Métodos.

## 6. Discusión.

### 6.1 Extinción del virus de la hepatitis C mediada por ribavirina.

Las altas tasas de mutación y la dinámica de cuasiespecies confieren una elevada capacidad adaptativa a los virus RNA. Existen diferentes estrategias terapéuticas para enfrentarse a esta situación como por ejemplo las terapias de combinación (uso de más de una sustancia antiviral al mismo tiempo), las drogas dirigidas a factores celulares necesarios en algún paso del ciclo viral, combinación de inmunoterapia con quimioterapia y la mutagénesis letal [revisado en (Domingo et al, 2012)].

En nuestro laboratorio se han empleado FMDV y LCMV como sistemas modelo para el estudio de la dinámica de cuasiespecies y la mutagénesis letal. Estos estudios han permitido alcanzar algunas conclusiones que se detallan en la Tabla 6.1 [recopilado de (Domingo et al, 2012)] así como sentar las bases del trabajo con HCV realizado en la presente Tesis Doctoral.

**Tabla 6.1. Conclusiones alcanzadas sobre las terapias basadas en mutagénesis letal.**

<u>Bajo fitness</u> (capacidad replicativa) y <u>baja carga viral</u> (tamaño poblacional) favorecen la extinción.
La <u>secuencia consenso</u> permanece constante a lo largo del tratamiento.
Bajada de la <u>infectividad específica</u> en la transición hacia la extinción.
Incremento de la <u>frecuencia de mutación</u> y de la <u>complejidad</u> de la población.
Las <u>terapias de combinación</u> (mutágeno e inhibidor) son más efectivas que la administración aislada de cada uno de ellos.
La <u>terapia secuencial</u> (inhibidor → mutágeno) puede ser más ventajosa que la de combinación.

La mutagénesis letal es una estrategia antiviral que está tomando fuerza gradualmente. Se visualiza cada vez más como una potente terapia frente a virus, con la ventaja de contar con una reducida probabilidad de selección de mutantes de escape (Baranovich et al, 2013; Dapp et al, 2009; Dapp et al, 2013). Existen perspectivas de ampliar la aplicación de estos principios a la terapia anticáncer (Fox & Loeb, 2010; Loeb, 2011; Solé & Deisboeck, 2004). Actualmente ya se están utilizando análogos de nucleótido frente a cáncer aunque no se ha demostrado que ejerzan su acción anticancerosa a través de la mutagénesis letal. Hoy en día, el 5-fluorouracilo es uno de los principales agentes para tratar cánceres originados en el tracto gastrointestinal y es considerado una de las drogas básicas en el tratamiento (van Kuilenburg & Maring, 2013).

Para poder investigar experimentalmente mutagénesis letal de HCV en cultivos celulares, la primera cuestión a abordar fue si realmente R actúa como agente mutagénico para

el virus en nuestras condiciones experimentales. Los resultados obtenidos han demostrado que R ejerce una actividad mutagénica sobre la replicación de HCV en células Huh-7.5 (apartado 5.1 de Resultados). Se han observado aumentos estadísticamente significativos de la complejidad de los espectros de mutantes y un aumento de la frecuencia de transiciones G→A y C→U como se espera de la actividad mutagénica de R (apartado 2.6.1 de Introducción). Se analizaron espectros de mutantes de HCV pasado en ausencia y presencia de R empleando dos metodologías distintas: clonaje molecular-secuenciación Sanger y UDPS. Como resultado de los análisis realizados empleando UDPS se identificaron en la región genómica NS5A un total de 38 y 127 mutaciones diferentes en las poblaciones pasadas en ausencia y presencia de R, respectivamente (Anexo 2). Las mismas poblaciones analizadas empleando clonación molecular y secuenciación de Sanger presentaron un total de 28 y 46 mutaciones, respectivamente (Anexo 1). Del número total de mutaciones distintas identificadas únicamente 5 y 12, en ausencia y presencia de R, respectivamente, fueron comunes entre la secuenciación de Sanger y UDPS. Por tanto, a pesar de que en ambos muestreos se analizasen diferentes secuencias o clones de las mismas poblaciones virales, ambos procedimientos han proporcionado evidencias claras de la actividad mutagénica de R para HCV. Un mero cambio en la composición del espectro de mutantes no es necesariamente una consecuencia de actividad mutagénica, ya que una droga puede alterar el *fitness* relativo de subpoblaciones virales y ello podría variar la amplitud del espectro de mutantes. Sin embargo, resulta improbable que una posible reorganización del espectro de mutantes pudiese dar lugar a un aumento de la complejidad del espectro de mutantes, acompañado de un sesgo mutacional tan claro a favor de transiciones G→A y C→U, en ausencia de una actividad mutagénica asociada al tratamiento con R.

Los tipos de mutaciones que provoca el tratamiento con la R, así como la proporción de nucleótidos encontrados en el nucleótido vecino 5' (22% A, 26% G, 8% U y 44% C) y el vecino 3' (18% A, 31% G, 12% U, 39% C) del sitio de cada mutación en el gen NS5A (valores que reflejan aproximadamente la composición de bases de esta región genómica) indican que es poco probable la participación de actividades ADAR en la mutagénesis observada tras la exposición de HCV a R (Lehmann & Bass, 2000; Nishikura, 2010). Es decir, los datos moleculares apoyan una acción mutagénica debida a R y no a factores celulares mutagénicos que pudieran inducirse por la presencia de R.

El desbalance de nucleótidos se descartó también como causa de la mutagénesis ocasionada por R. La importante disminución de los niveles intracelulares de GTP (de hasta 8,5 veces tras 72 horas de tratamiento con R 100 µM) no explica la mayor parte de la mutagénesis, ya que una bajada similar del nivel de GTP como resultado del tratamiento con MPA no generó el mismo nivel de mutagénesis en los espectros de mutantes analizados (Tabla

5.1.6.1). Este inmunosupresor y algunas de sus prodrogas han demostrado ser eficaces como inhibidores de la replicación de HCV en cultivo celular e *in vivo*, sin evidencia de que puedan actuar mediante mutagénesis letal (Henry et al, 2006; Mori et al, 2011; Pan et al, 2012; Ye et al, 2012). Fue también muy significativo que durante la transición a la extinción causada por el MPA no se alterase la infectividad específica de HCV. Se observó que la infectividad era detectable cuando el RNA extracelular de HCV ya no lo era, una observación totalmente contraria a lo esperable cuando hay extinción mediada por mutagénesis letal. Sin embargo, tuvo lugar una disminución de la infectividad específica en presencia de R, un sello de mutagénesis letal (Agudo et al, 2010; Airaksinen et al, 2003; González-López et al, 2005; Grande-Pérez et al, 2005; Moreno et al, 2011; Moreno et al, 2012; Sierra et al, 2007) (Fig. 5.1.7 y Tabla 6.1).

Existen diferentes posibilidades para explicar los resultados contradictorios sobre el carácter mutagénico de la R sobre HCV. El primero es que el virus haya sido sometido a un número limitado de rondas de replicación en presencia de R, insuficientes para detectar un aumento significativo en la complejidad del espectro de mutantes. De hecho, uno de los resultados negativos se basó en una exposición de tan sólo 72 horas a R (Mori et al, 2011). En nuestras manos, una sola infección en presencia de R puede ser insuficiente para demostrar una acción mutagénica (resultados no publicados). La R puede producir expansiones transitorias de la complejidad del espectro de mutantes de manera que una actividad mutacional podría no observarse dependiente del tiempo post-infección al que se realice el muestreo del espectro de mutantes (Ojosnegros et al, 2008; Perales et al, 2011). Además, es imprescindible cuantificar el molde de RNA de HCV antes de proceder a amplificarlo por RT-PCR y asegurar que los clones secuenciados sean una muestra correcta del repertorio presente en la muestra natural. Las cargas virales bajas, tales como las producidas por acción de una droga como R tienden a subestimar la complejidad del espectro de mutantes si las cantidades del molde para la amplificación por RT-PCR son insuficientes. Estas posibles fuentes de sesgo se aplican a las determinaciones de la complejidad del espectro de mutantes, tanto en cultivos celulares como *in vivo*, y deben ser cuidadosamente evaluadas al comparar resultados de diferentes estudios.

Hay evidencias que sugieren que R es también mutagénica para HCV *in vivo* (Cuevas et al, 2009; Dietz et al, 2013). Todavía no está claro si la inhibición de la producción de progenie de HCV está directamente relacionada con la actividad mutagénica de R o si existen otros mecanismos de acción de la droga sobre el virus o la célula huésped que también contribuyen a su efecto antiviral. En las terapias combinadas la interacción entre el inhibidor y el agente mutagénico podría afectar al momento en el que se puede observar un aumento en la

complejidad del espectro de mutantes (Iranzo et al, 2011; Perales et al, 2012). En referencia a esto, es significativo que la evidencia de actividad mutagénica *in vivo* fuera obtenida durante monoterapia con R (Dietz et al, 2013) donde además se obtiene un incremento significativo de las transiciones G→A y C→U en las poblaciones de virus tratadas con R, resultados similares a los obtenidos en esta Tesis Doctoral con células de hepatoma humano. Un argumento que se ha esgrimido en contra de la actividad mutagénica de la R durante la terapia es que el nivel intracelular de R en hepatocitos es poco probable que alcance las concentraciones utilizadas en cultivos celulares (en nuestro caso entre 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M, que son de 3 a 100 veces mayores respecto a las concentraciones que se consideran alcanzables durante la terapia *in vivo*) (Feld et al, 2010). Sin embargo debe tenerse en cuenta que se han cuantificado un amplio rango de concentraciones de R en suero y en órganos diana del HCV de humanos (Anderson & Rahal, 2002; Connor et al, 1993; Crumacker et al, 1986; Gilbert & Knight, 1986; Jordan et al, 2000; Ogle et al, 1989; Rankin et al, 1989; Slavenburg et al, 2011). Además, no se ha cuantificado la concentración de RTP ni en las células del hígado ni en los complejos de replicación de HCV. Tampoco se han medido las concentraciones de RMP y RDP, que serían informativas de las actividades potenciales de los metabolitos derivados de R durante el tratamiento. Por lo tanto, no es posible relacionar los resultados en células de hepatoma en cultivo con los resultados *in vivo* ya sea para apoyar o no una actividad mutagénica de R sobre HCV *in vivo*.

Posibles mecanismos alternativos o adicionales a la mutagénesis son la inducción de la expresión de ISGs (Thomas et al, 2011), inhibición de la replicación (terminación de cadena) cuando se incorporan varios residuos de RMP en una misma cadena de RNA de HCV (Vo et al, 2003), inhibición de la traducción a través de la unión a eIF5B que impide la formación de complejo de iniciación 80S (Galmozzi et al, 2012) o su capacidad inmunomoduladora (Hultgren et al, 1998; Ning et al, 1998).

A pesar de que se anticipaba que la compensación de la inhibición ejercida por R debida a la presencia de Gua se debería al restablecimiento de niveles intracelulares de GTP, el principal efecto de Gua fue atenuar los aumentos de ATP, CTP y UTP intracelular (Fig. 5.1.5.4 de Resultados). Esta observación no había sido descrita hasta el momento y contrasta con resultados anteriores empleando otros tipos celulares que mostraron que la adición de Gua exógena únicamente compensó la bajada de GTP provocada por R (Airaksinen et al, 2003; Kerr, 1987; Lanford et al, 2001; Zimmerman & Deeprose, 1978). Las concentraciones de MPA que produjeron una bajada en el nivel de GTP similar al producido por R generaron también un aumento de los niveles de ATP, CTP y UTP, aunque estos incrementos fueron menos acentuados que los producidos por R (Fig. 5.1.6.3 de Resultados). Por lo tanto, los



desequilibrios en los niveles de nucleótidos estándar podrían contribuir también a la inhibición producida por R y este efecto se sumaría a una acción mutagénica directa de R.

La adición de Gua no tiene el mismo efecto sobre la replicación de otros virus en presencia de R. En una infección persistente de FMDV en células BHK-21, Gua revirtió parcialmente la actividad inhibitoria, pero no mutagénica de R. Sin embargo Gua compensó la modesta actividad mutagénica inducida por la bajada en el nivel GTP que produce el MPA (Airaksinen et al, 2003). La Gua eliminó en gran medida la inhibición sobre la producción de progenie de LCMV provocada por la R o el MPA (Moreno et al, 2011) y en el caso de los *Nidovirus* porcinos Gua revirtió el efecto inhibitorio de la R (Kim & Lee, 2013). Estas diferencias pueden residir en las polimerasas virales (o sus complejos de replicación), dependiendo de su afinidad por el RTP, de su respuesta a desbalances de nucleótidos y a otras alteraciones metabólicas.

Estudios anteriores han establecido la importancia de los niveles de nucleótidos en la replicación de HCV en otras líneas celulares de hepatoma. Así, el tratamiento de células HepG2 con R produce una bajada importante en el nivel de GTP que provoca modificaciones de la transcripción de genes cuya expresión afecta al ciclo de vida del virus (Suzuki et al, 2013). Por otro lado, el nivel de ATP intracelular que en nuestros experimentos sufre un incremento tras el tratamiento con R y MPA respecto a células control (Figs. 5.1.5.4 y 5.1.6.3 de Resultados), se distribuye dentro de la célula heterogéneamente en células de hepatoma infectadas por HCV. El ATP co-localiza con proteínas no estructurales de HCV como NS5A de modo que la concentración de ATP es aproximadamente 5 veces mayor en los complejos replicativos que en otros sitios de la célula, por lo que cambios en el nivel de ATP pueden alterar el buen funcionamiento de los complejos de replicación (Ando et al, 2012). Además, los niveles de ATP pueden modificar la actividad de la chaperona molecular dependiente de ATP, HSP90, que desempeña un papel crítico en la fosforilación de la proteína NS5B de HCV (Kim et al, 2012). Por último, cabe destacar la importancia del nivel de GTP durante algunos pasos del proceso de traducción (apartado 2.4.4 de Introducción). Por lo tanto, la formación y la actividad de los complejos de proteínas implicados en la replicación y traducción de HCV pueden ser incluso más sensibles al desequilibrio del nivel de los nucleótidos que la propia mutagénesis asociada a R. No obstante, no se puede excluir que el MPA muestre otras actividades anti-HCV distintas de la derivada de la inhibición de la IMPDH, como el incremento de la expresión de ISGs (Pan et al, 2012).

Ensayos bioquímicos mostraron que las polimerasas de HCV de subtipos 1b y 2a incorporaron R en lugar de G de modo similar (Fig 5.1.8.2 de Resultados), a pesar de que el subtipo 1b responde menos al tratamiento estándar que el 2a (apartado 2.5 de Introducción). Ello sugiere que la respuesta al tratamiento no se debe a la eficiencia de incorporación de la R por parte de la polimerasa, sino a otros factores relevantes como podría ser la proteína NS5A que cuenta con la región IRRDR (apartado 2.4.3 de Introducción).

Los análisis de los eventos moleculares que subyacen a la transición hacia la extinción de HCV han indicado una persistencia de RNA de HCV no infeccioso (Fig. 5.1.3.2 de Resultados). Existen descripciones clínicas sobre la presencia de RNA de HCV en pacientes que muestran una respuesta sostenida al tratamiento (Maylin et al, 2008; Pham et al, 2010; Welker & Zeuzem, 2009). La naturaleza de este RNA persistente de HCV en cultivos celulares se está estudiando actualmente en nuestro laboratorio. Estos RNAs no infecciosos podrían corresponderse con variantes defectivos o defectores de HCV (apartado 2.3 de Introducción). Su posible participación en la extinción de HCV en cultivos celulares e *in vivo* merece ser investigada.

## **6.2 La guanosina como mediadora de una actividad antiviral contra el virus de la hepatitis C.**

La inhibición de la replicación de HCV por exceso de Gua fue un resultado inesperado al tratarse de un metabolito natural para el que previamente no se había descrito una acción antivírica.

El tratamiento con Gua produjo una alteración del espectro de mutantes, observándose un incremento en la complejidad y en las frecuencias de mutación máxima y mínima (Tabla 5.2.5.1 de Resultados), aunque la observación más destacable fue la identificación de numerosas inserciones y deleciones en las poblaciones tratadas con Gua (Tabla 5.2.5.2 de Resultados). En nuestro laboratorio, en el momento de redactar esta Tesis, se han secuenciado un total de 1.216.729 nucleótidos de genomas de HCV (recopilación de I. Gallego y C. Perales). Se han observado un total de 3 deleciones y 7 inserciones, todas ellas de 1 nucleótido. Las frecuencias de *indels* son de  $8 \times 10^{-6}$ , frente a los  $3,6 \times 10^{-4}$  y  $1,4 \times 10^{-4}$  para los *indels* encontrados en poblaciones tratadas con Gua 500 y 800  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Estas diferencias son estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$  y  $p < 0.0001$ ; test  $\chi^2$ ). Cabe añadir la identificación de 6 deleciones de más de un nucleótido en los 33.339 nucleótidos secuenciados de genomas que replican en presencia de Gua 500  $\mu\text{M}$  (Tabla 5.2.5.2 y Fig. 5.2.5.2 de Resultados), frente a ninguna en los 1.216.729 nucleótidos totales de HCV analizados en

nuestro laboratorio. Ello implica que Gua no afecta a una función viral que meramente ralentiza la multiplicación del virus sino que afecta a la calidad del proceso de replicación del RNA viral por alteración de la polimerasa o del complejo replicativo que repercute en la fidelidad de copia. Todas las deleciones e inserciones encontradas provocaron la aparición de un codón de STOP prematuro, por lo que es improbable que correspondan a genomas competentes en replicación, aunque no podemos excluir que puedan ser mantenidos en la población por complementación, ejerciendo una acción interferente sobre otros genomas inalterados (apartado 2.3 de Introducción). Desafortunadamente los análisis de espectros de mutantes solo pudieron realizarse para un fragmento corto del genoma de HCV ya que otras regiones genómicas (como NS5B y NS5A) no pudieron amplificarse. Esto puede deberse alteraciones del genoma viral que impedirían su copia por RT-PCR. Este es un punto que va a estudiarse en nuestro laboratorio.

Estudios anteriores en otros laboratorios en los que se analizaron espectros de mutantes (en las regiones EI-E2 y los dominios PKR-BD y V3 de NS5A) de pacientes infectados con HCV de genotipo 1a y 1b (sometidos o no a tratamiento) indican que, aun siendo todas ellas poco comunes, las deleciones son todavía menos frecuentes que las inserciones y ello se ha atribuido a la selección negativa que sufren los mutantes con deleciones (Torres-Puente et al, 2007). Sin embargo, esos resultados contrastan con los análisis de cuasiespecies realizados en nuestro laboratorio que muestran una dominancia de deleciones (Ortega-Prieto et al, 2013; recopilación de I. Gallego y C. Perales). Todos los datos disponibles concuerdan con una tendencia a producir deleciones e inserciones desencadenada por Gua sobre HCV.

La acción de Gua sobre HCV muestra características de mutagénesis letal por varias razones. En primer lugar, la bajada de infectividad siempre precede a la de RNA viral (Fig. 5.2.3.1 de Resultados). Además, a pesar de la actividad mutagénica que ejerció la Gua sobre HCV, la secuencia consenso del virus permaneció inalterada en las cuasiespecies analizadas. Todas las mutaciones e *indels* se identificaron en componentes del espectro de mutantes, no en las secuencias consenso. Por último, es muy importante destacar que la infectividad específica sufrió una disminución estadísticamente significativa respecto al control sin Gua durante los primeros pases del virus, en los que los valores de infectividad y RNA viral pudieron medirse de modo fiable.

Ade, Cit o Uri no mostraron actividad antiviral como la ejercida por Gua, en pases seriados realizados en las mismas condiciones (Fig 5.2.4.1 de Resultados). Sin embargo, el valor de IC<sub>50</sub> para Ade fue menor que para Gua (Fig 5.2.2 de Resultados). Esto muestra que el

carácter inhibitorio de un metabolito medido en un solo pase (tal y como se mide la  $IC_{50}$ ) no necesariamente anticipa su efecto tras una exposición prolongada sobre un virus replicante.

La Gua también ejerce acción antiviral sobre una población de HCV evolucionada, HCVp100, aunque no existe pérdida de infectividad a lo largo de 5 pases (Fig 5.2.7 de Resultados). Este virus tiene un *fitness* alto y muestra resistencia incrementada a una amplia variedad de antivirales en comparación con HCVp0 (Sheldon et al, 2014). Por tanto, la acción inhibitoria de Gua sigue las pautas de los DAAs actualmente en estudio en nuestro laboratorio.

Diversos experimentos control demostraron que Gua no inhibe la replicación de otros virus RNA (Fig. 5.2.8.3), lo que descarta que Gua ejerza una acción inespecífica sobre la replicación vírica y hace interesante averiguar la base de su actividad para HCV. El VSV no fue inhibido por Gua en células Huh-7.5, descartando que el efecto inhibitorio de Gua sobre HCV se deba exclusivamente a algún factor presente en las células Huh-7.5, sin participación del virus.

El tratamiento de células Huh-7.5 reporter con Gua produjo un incremento general de los niveles de nucleótidos intracelulares (Fig. 5.2.3.2 de Resultados). El aumento de los NTPs es equitativo y la relación entre ellos permanece constante. Sin embargo, el aumento de los NDPs no sigue el mismo patrón, existiendo un gran incremento de las purinas respecto a las pirimidinas, generándose una disminución de la relación NTP/NDP que resultó especialmente baja para el ATP/ADP. En nuestros análisis por HPLC los niveles de NMPs fueron indetectables. Hay varios mecanismos a través de los cuales el desbalance de nucleótidos intracelulares puede ejercer una acción mutagénica o inhibidora. Los cambios en el nivel de ATP pueden alterar el complejo de replicación (apartado 6.1) (Ando et al, 2012). La relación ATP/ADP afecta al metabolismo lipídico de la célula (apartado 2.4.3.2 y 2.4.4 de Introducción). Cuando la relación ATP/ADP cae, se activa la vía catabólica para sintetizar ATP. Si la velocidad de síntesis de ATP no es suficiente para contrarrestar la bajada, o su consumo es alto, se produce un incremento en los niveles de ADP y AMP. Ello activa a la AMPK, mediante la fosforilación de su Thr172, lo que promueve la restauración del balance energético celular e inhibe los procesos que consumen ATP. Se ha demostrado que HCV inhibe a la proteína AMPK por desfosforilación de Thr172 y la fosforilación de Ser485. Sin embargo, la inactivación de AMPK por parte de HCV es ineficaz cuando la relación ATP/ADP está fuertemente desbalanceada o se usan activadores de la AMPK como AICAR y metformina (Mankouri et al, 2010). En estos casos deja de haber acumulación de ácidos grasos y colesterol y se inhibe la replicación viral. La relación ATP/ADP descendió hasta 3,9 veces tras la exposición de las

células a Gua (Fig 5.2.3.3 de Resultados). Por ello, ésta es una de las posibilidades que está siendo explorada actualmente en nuestro laboratorio ya que podría explicar la inhibición de HCV por Gua.

El nivel de GTP, que desciende respecto al de GDP durante el tratamiento con Gua, también juega un papel importante durante el ciclo de vida de HCV. Hay proteínas dependientes de GTP, incluidas las que participan en traducción como el factor eIF5B (apartados 2.4.4 de Introducción y 6.1). Varias de ellas son necesarias para la entrada del virus en la célula (como HRas) o su replicación (como GBF1) (Goueslain et al, 2010; Zona et al, 2013). La proteína Rab18, que se localiza en las gotas lipídicas, también es dependiente de GTP y promueve la asociación de estas gotas a proteínas incluidas en el complejo de replicación como es la NS5A (Salloum et al, 2013). En nuestro laboratorio continúan las investigaciones para tratar de identificar funciones celulares que pudieran alterarse como resultado de la exposición a Gua.

La RdRp NS5B presenta cierta actividad correctora de errores ya que es capaz de escindir el CMP si está desapareado. Esta actividad de escisión es dependiente de UTP, CTP y, sobre todo, de ATP (Jin et al, 2013). Aunque los niveles de nucleótidos de poblaciones tratadas con Gua se encuentran alterados no hemos observado un incremento preferencial de mutaciones generadas a partir de la incorporación incorrecta de CMP (Fig. 5.2.3.2). NS5B presenta un sitio alostérico de unión a GTP que ejerce una actividad reguladora durante la síntesis de RNA viral modulando las interacciones entre los dominios *fingers* y *thumb* (Di Marco et al, 2005). Ensayos *in vitro* han mostrado que la velocidad de la actividad helicasa ejercida por la proteína NS3 es dependiente del nivel de nucleótidos en solución (Belon & Frick, 2009). Por tanto, se podría pensar que los niveles de nucleótidos alterados podrían afectar a la actividad de NS5B y NS3. Se están realizando experimentos con NS5B en colaboración con el grupo del Dr. Antonio Mas para investigar este punto.

Este no es el primer caso en el que se ha descrito una actividad mutagénica sobre un virus causada por un desbalance nucleotídico. Vartanian y colaboradores consideraron que un desbalance entre dNTPs incrementaba la tasa de mutación del HIV-I, pero no advirtieron la implicación de APOBEC en mutagénesis de HIV-I (Vartanian et al, 1994). El mismo grupo desarrolló una PCR mutagénica basada en desbalance de nucleótidos (Martinez et al, 1994), que ha sido muy útil para la preparación de formas altamente mutadas de proteínas de interés. Recientemente se ha descrito que la inhibición de la ruta de biosíntesis de pirimidinas suprime la replicación de algunos virus a través de la inmunidad innata por expresión de ISGs (Lucas-Hourani et al, 2013). El tratamiento con Gua no inhibe la ruta de síntesis de pirimidinas, sino

que incrementa el nivel de las purinas respecto a las pirimidinas (Fig. 5.2.3.2 de Resultados). Por tanto no es descartable que a través del tratamiento con Gua se esté generando un escenario similar de desbalance de purinas frente a pirimidinas. A pesar de que esta vía de inhibición es compatible con los resultados obtenidos durante el tratamiento con Gua, difícilmente explicaría la acción inhibitoria del nucleósido ya que VSV, un virus muy sensible a IFN y expresión de ISGs, no se vio inhibido por Gua (apartado 5.2.8.4 de Resultados).

Estudios sobre el desbalance de dNTPs muestran que puede tener un efecto mutagénico y citotóxico sobre las células (Rampazzo et al, 2010). Los desbalances de dNTPs en levaduras inducen mutaciones puntuales, deleciones e inserciones (Kumar et al, 2010) y pueden afectar el avance de la horquilla de replicación (Kumar et al, 2011; Poli et al, 2012).

El tratamiento combinado empleando una alta concentración de Gua junto a R y MPA produce efectos muy diferentes sobre HCV. La Gua no atenúa el efecto de la R sino que ambas ejercen una acción inhibitoria juntas y por separado. Sin embargo, el MPA y la Gua inhiben fuertemente a HCV por separado, pero no de manera conjunta (Figs. 5.2.9.1 y 5.2.10.1 de Resultados). La bajada de la relación ATP/ADP y el desbalance entre purinas y pirimidinas causados por la Gua se anulan por incorporación de cualquiera de las dos drogas, R y MPA, pero a diferencia del MPA la R ejerce una actividad mutagénica por incorporación en la cadena de RNA nascente que no dependería de la relación entre nucleótidos.

La metformina es un medicamento usado para tratar la diabetes (con carácter antiviral frente a HCV) que produce la activación del enzima AMPK a través del incremento del AMP y ADP citosólico, una alteración de la relación ATP/ADP muy similar a la producida por Gua. Ensayos clínicos sobre la incorporación de metformina a la terapia estándar de la enfermedad muestran que la respuesta al tratamiento no mejora y no se produce SVR (Mankouri & Harris, 2011). Esto puede deberse a que R y metformina tienen efectos antagónicos sobre los niveles de nucleótidos, como ocurre con R y Gua.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran que el HCV es un virus extingible mediante protocolos de mutagénesis letal. Además, se ha demostrado que Gua puede desencadenar también una acción antiviral con características de mutagénesis letal. Estos estudios abren la posibilidad de que la alteración de vías metabólicas celulares pueda constituir una estrategia complementaria a la acción de agentes antivirales para producir reducciones de carga viral y favorecer la extinción de HCV.

## 7. Conclusiones.

1. La extinción de HCV mediada por ribavirina en células de hepatoma humano ocurre a través de mutagénesis letal, a juzgar por el aumento de la complejidad de los espectros de mutantes, invariancia de la secuencia consenso y descenso de infectividad específica.
2. La ribavirina incrementa significativamente la frecuencia de transiciones G→A y C→U en el genoma de HCV. Los ensayos bioquímicos con la polimerasa del HCV muestran una alta incorporación de ribavirina frente a C, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en cultivos celulares. El tratamiento con ribavirina produce un incremento de ATP, CTP y UTP y un descenso de GTP intracelular. La guanosina exógena no revierte la bajada de GTP, pero atenúa el incremento del resto de nucleótidos.
3. La guanosina, pero no los demás nucleótidos estándar, inhibe la producción de HCV infeccioso en cultivos celulares. El tratamiento con guanosina produce un incremento de NTPs y NDPs con una disminución de la relación intracelular NTP/NDP. Los nucleótidos derivados de bases purínicas aumentan más que los de bases pirimidínicas.
4. La inhibición de HCV mediada por guanosina parece ocurrir a través de mutagénesis letal ya que aumenta la complejidad en los espectros de mutantes sin alterar la secuencia consenso y genera una bajada de la infectividad específica. La presencia de guanosina ocasiona numerosas deleciones e inserciones, lo que sugiere que podría afectar a una función replicativa del virus.
5. El tratamiento combinado de ácido micofenólico y guanosina anula el efecto antiviral que tiene cada uno por separado. Sin embargo, guanosina y ribavirina ejercen una acción inhibitoria tanto juntas como aisladamente. La bajada de la relación ATP/ADP y el desbalance entre purinas y pirimidinas causados por la guanosina se anulan por la presencia de ribavirina o ácido micofenólico.
6. El mecanismo antiviral de guanosina sobre HCV abre la posibilidad de favorecer la extinción de virus por mutagénesis letal a través de la modulación metabólica.





## 8. Bibliografía.

**A**gnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX (1999) Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12766-12771

Ago H, Adachi T, Yoshida A, Yamamoto M, Habuka N, Yatsunami K, Miyano M (1999) Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure* **7**: 1417-1426

Agol VI (2006) Molecular mechanisms of poliovirus variation and evolution. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**: 211-259

Agudo R, Ferrer-Orta C, Arias A, de la Higuera I, Perales C, Perez-Luque R, Verdaguer N, Domingo E (2010) A multi-step process of viral adaptation to a mutagenic nucleoside analogue by modulation of transition types leads to extinction-escape. *PLoS Pathog* **6**: e1001072

Airaksinen A, Pariente N, Menendez-Arias L, Domingo E (2003) Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* **311**: 339-349

Alcami A (2003) Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat Rev Immunol* **3**: 36-50

Anderson JF, Rahal JJ (2002) Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro. *Emerg Infect Dis* **8**: 107-108

Anderson JP, Daifuku R, Loeb LA (2004) Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annu Rev Microbiol* **58**: 183-205

Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T (2012) Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathog* **8**: e1002561

Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, Pol S, Brechot C, Paranhos-Baccala G, Lotteau V (2002) Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* **76**: 6919-6928

Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R (2005) Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol* **79**: 3187-3194

Arias A, Lázaro E, Escarmís C, Domingo E (2001) Molecular intermediates of fitness gain of an RNA virus: characterization of a mutant spectrum by biological and molecular cloning. *J Gen Virol* **82**: 1049-1060

Asahina Y, Izumi N, Enomoto N, Uchihara M, Kurosaki M, Onuki Y, Nishimura Y, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Kitamura T, Miyake S (2005) Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol* **43**: 623-629

**B**alzarini J, Karlsson A, Wang L, Bohman C, Horska K, Votruba I, Fridland A, Van Aerschot A, Herdewijn P, De Clercq E (1993) Eicar (5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-

carboxamide). A novel potent inhibitor of inosinate dehydrogenase activity and guanylate biosynthesis. *J Biol Chem* **268**: 24591-24598

Baranovich T, Wong SS, Armstrong J, Marjuki H, Webby RJ, Webster RG, Govorkova EA (2013) T-705 (Favipiravir) Induces Lethal Mutagenesis in Influenza A H1N1 Viruses In Vitro. *J Virol* **87**: 3741-3751

Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Pariente N, Verdaguer N, Domingo E (2003) Evolution of cell recognition by viruses: a source of biological novelty with medical implications. *Adv Virus Res* **62**: 19-111

Baranowski E, Sevilla N, Verdaguer N, Ruiz-Jarabo CM, Beck E, Domingo E (1998) Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **72**: 6362-6372

Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F (2013) The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol* **11**: 482-496

Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Toida T, Van Kuppevelt TH, Depla E, Von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF (2003) Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* **278**: 41003-41012

Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* **197**: 633-642

Bassendine MF, Sheridan DA, Felmlee DJ, Bridge SH, Toms GL, Neely RD (2011) HCV and the hepatic lipid pathway as a potential treatment target. *J Hepatol* **55**: 1428-1440

Batschelet E, Domingo E, Weissmann C (1976) The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene* **1**: 27-32

Belon CA, Frick DN (2009) Fuel specificity of the hepatitis C virus NS3 helicase. *J Mol Biol* **388**: 851-864

Benarroch D, Egloff MP, Mulard L, Guerreiro C, Romette JL, Canard B (2004) A structural basis for the inhibition of the NS5 dengue virus mRNA 2'-O-methyltransferase domain by ribavirin 5'-triphosphate. *J Biol Chem* **279**: 35638-35643

Bergelson JM (2003) Virus interactions with mucosal surfaces: alternative receptors, alternative pathways. *Curr Opin Microbiol* **6**: 386-391

Bernad A, Blanco L, Lazaro JM, Martin G, Salas M (1989) A conserved 3'→5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* **59**: 219-228

Biebricher CK, Eigen M (2006) What is a quasispecies? *Current Topics in Microbiol and Immunol* **299**: 1-31

Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouille Y (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **80**: 6964-6972

Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM (2000) Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **290**: 1972-1974

Blight KJ, McKeating JA, Rice CM (2002) Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **76**: 13001-13014

Borderia AV, Lorenzo-Redondo R, Pernas M, Casado C, Alvaro T, Domingo E, Lopez-Galindez C (2010) Initial fitness recovery of HIV-1 is associated with quasispecies heterogeneity and can occur without modifications in the consensus sequence. *PLoS One* **5**: e10319

Borrego B, Novella IS, Giralte E, Andreu D, Domingo E (1993) Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the presence or absence of immune selection. *J Virol* **67**: 6071-6079

Bougie I, Bissillon M (2004) The broad spectrum antiviral nucleoside ribavirin as a substrate for a viral RNA capping enzyme. *J Biol Chem* **279**: 22124-22130

Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratnien M, Targett-Adams P, Lavergne JP, Penin F, McLauchlan J (2006) Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* **281**: 22236-22247

Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL (2005) The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* **25**: 105-117

Bressanelli S, Tomei L, Rey FA, De Francesco R (2002) Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J Virol* **76**: 3482-3492

Buenz EJ, Howe CL (2006) Picornaviruses and cell death. *Trends Microbiol* **14**: 28-36

Bukh J (2012) Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Gastroenterology* **142**: 1279-1287 e1273

Carman W, Thomas H, Domingo E (1993) Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet* **341**: 349-353

Carrere-Kremer S, Montpellier C, Lorenzo L, Brulin B, Cocquerel L, Belouzard S, Penin F, Dubuisson J (2004) Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *J Biol Chem* **279**: 41384-41392

Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, Silvestry M, Kuhn RJ, Rice CM (2013) Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 9505-9510

Chevaliez S, Brillet R, Lazaro E, Hezode C, Pawlotsky JM (2007) Analysis of ribavirin mutagenicity in human hepatitis C virus infection. *J Virol* **81**: 7732-7741

Chevaliez S, Pawlotsky JM (2007) Interferon-based therapy of hepatitis C. *Adv Drug Deliv Rev* **59**: 1222-1241

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**: 359-362

Chung DH, Sun Y, Parker WB, Arterburn JB, Bartolucci A, Jonsson CB (2007) Ribavirin reveals a lethal threshold of allowable mutation frequency for Hantaan virus. *J Virol* **81**: 11722-11729

- Connor E, Morrison S, Lane J, Oleske J, Sonke RL, Connor J (1993) Safety, tolerance, and pharmacokinetics of systemic ribavirin in children with human immunodeficiency virus infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **37**: 532-539
- Contreras AM, Hiasa Y, He W, Terella A, Schmidt EV, Chung RT (2002) Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J Virol* **76**: 8505-8517
- Crotty S, Cameron C, Andino R (2002) Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J Mol Med* **80**: 86-95
- Crotty S, Cameron CE, Andino R (2001) RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 6895-6900.
- Crotty S, Gohara D, Gilligan DK, Karelsky S, Cameron CE, Andino R (2003) Manganese-dependent polioviruses caused by mutations within the viral polymerase. *J Virol* **77**: 5378-5388
- Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE (2000) The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med* **6**: 1375-1379
- Crumpper C, Bubley G, Lucey D, Hussey S, Connor J (1986) Ribavirin enters cerebrospinal fluid. *Lancet* **2**: 45-46
- Cuevas JM, Gonzalez-Candelas F, Moya A, Sanjuan R (2009) Effect of ribavirin on the mutation rate and spectrum of hepatitis C virus in vivo. *J Virol* **83**: 5760-5764
- Dapp MJ, Clouser CL, Patterson S, Mansky LM (2009) 5-Azacytidine can induce lethal mutagenesis in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **83**: 11950-11958
- Dapp MJ, Patterson SE, Mansky LM (2013) Back to the future: revisiting HIV-1 lethal mutagenesis. *Trends Microbiol* **21**: 56-62
- de la Torre JC, Alarcón B, Martínez-Salas E, Carrasco L, Domingo E (1987) Ribavirin cures cells of a persistent infection with foot-and-mouth disease virus *in vitro*. *J Virol* **61**: 233-235
- de la Torre JC, Martínez-Salas E, Diez J, Villaverde A, Gebauer F, Rocha E, Dávila M, Domingo E (1988) Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **62**: 2050-2058
- Denison MR, Graham RL, Donaldson EF, Eckerle LD, Baric RS (2011) Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol* **8**: 270-279
- Deuffic-Burban S, Poynard T, Sulkowski MS, Wong JB (2007) Estimating the future health burden of chronic hepatitis C and human immunodeficiency virus infections in the United States. *J Viral Hepat* **14**: 107-115
- Di Marco S, Volpari C, Tomei L, Altamura S, Harper S, Narjes F, Koch U, Rowley M, De Francesco R, Migliaccio G, Carfi A (2005) Interdomain communication in hepatitis C virus polymerase abolished by small molecule inhibitors bound to a novel allosteric site. *J Biol Chem* **280**: 29765-29770
- Dietz J, Schelhorn SE, Fitting D, Mihm U, Susser S, Welker MW, Fuller C, Daumer M, Teuber G, Wedemeyer H, Berg T, Lengauer T, Zeuzem S, Herrmann E, Sarrazin C (2013) Deep

sequencing reveals mutagenic effects of ribavirin during monotherapy of HCV genotype 1-infected patients. *J Virol* **87**: 6172-6181

Dixit NM, Layden-Almer JE, Layden TJ, Perelson AS (2004) Modelling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. *Nature* **432**: 922-924

Dixit NM, Perelson AS (2006) The metabolism, pharmacokinetics and mechanisms of antiviral activity of ribavirin against hepatitis C virus. *Cell Mol Life Sci* **63**: 832-842

Domingo E, (ed.). (2005) Virus entry into error catastrophe as a new antiviral strategy. *Virus Res* **107**: 115-228

Domingo E, Davila M, Ortin J (1980) Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* **11**: 333-346

Domingo E, Escarmís C, Sevilla N, Baranowski E (1998) Population dynamics in the evolution of RNA viruses. *Adv Exp Med Biol* **440**: 721-727

Domingo E, Gomez J (2007) Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res* **127**: 131-150

Domingo E, Martin V, Perales C, Grande-Perez A, Garcia-Arriaza J, Arias A (2006) Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**: 51-82

Domingo E, Sabo D, Taniguchi T, Weissmann C (1978) Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* **13**: 735-744

Domingo E, Sheldon J, Perales C (2012) Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**: 159-216

Donlin MJ, Cannon NA, Yao E, Li J, Wahed A, Taylor MW, Belle SH, Di Bisceglie AM, Aurora R, Tavis JE (2007) Pretreatment sequence diversity differences in the full-length hepatitis C virus open reading frame correlate with early response to therapy. *J Virol* **81**: 8211-8224

Dorner M, Horwitz JA, Donovan BM, Labitt RN, Budell WC, Friling T, Vogt A, Catanese MT, Satoh T, Kawai T, Akira S, Law M, Rice CM, Ploss A (2013) Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice. *Nature* **501**: 237-241

Dorner M, Horwitz JA, Robbins JB, Barry WT, Feng Q, Mu K, Jones CT, Schoggins JW, Catanese MT, Burton DR, Law M, Rice CM, Ploss A (2011) A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* **474**: 208-211

Douam F, Dao Thi VL, Maurin G, Fresquet J, Mompelat D, Zeisel MB, Baumert TF, Cosset FL, Lavillette D (2014) Critical interaction between E1 and E2 glycoproteins determines binding and fusion properties of hepatitis C virus during cell entry. *Hepatology* **59**: 776-788

Drake JW (1991) A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7160-7164

Drake JW, Holland JJ (1999) Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13910-13913

Echols H, Goodman MF (1991) Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu Rev Biochem* **60**: 477-511

Eckerle LD, Becker MM, Halpin RA, Li K, Venter E, Lu X, Scherbakova S, Graham RL, Baric RS, Stockwell TB, Spiro DJ, Denison MR (2010) Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog* **6**: e1000896

Eckerle LD, Lu X, Sperry SM, Choi L, Denison MR (2007) High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exonuclease mutants. *J Virol* **81**: 12135-12144

Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**: 5974-5984

Ehrenfeld E, Domingo E, Ross RP (2010) *The Picornaviruses*, Washington D.C.: ASM Press.

Eigen M (1971) Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**: 465-523

Eigen M (1993) Viral quasispecies. *Sci Am* **269**: 42-49

Eigen M (2002) Error catastrophe and antiviral strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 13374-13376.

Eigen M, Biebricher CK (1988) Sequence space and quasispecies distribution. In *RNA Genetics*, Domingo E, Ahlquist P, Holland JJ (eds), Vol. 3, pp 211-245. Boca Raton, FL.: CRC Press

Eigen M, McCaskill J, Schuster P (1988) Molecular quasi-species. *J Phys Chem* **92**: 6881-6891

Eigen M, Schuster P (1979) *The hypercycle. A principle of natural self-organization*, Berlin: Springer.

El-Shamy A, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H (2007) Prediction of efficient virological response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy by NS5A sequences of hepatitis C virus and anti-NS5A antibodies in pre-treatment sera. *Microbiol Immunol* **51**: 471-482

Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C (1996) Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* **334**: 77-81

Escarmís C, Dávila M, Charpentier N, Bracho A, Moya A, Domingo E (1996) Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J Mol Biol* **264**: 255-267

Evans MJ, Rice CM, Goff SP (2004) Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13038-13043

Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**: 801-805

Fan X, Mao Q, Zhou D, Lu Y, Xing J, Xu Y, Ray SC, Di Bisceglie AM (2009) High diversity of hepatitis C viral quasispecies is associated with early virological response in patients undergoing antiviral therapy. *Hepatology* **50**: 1765-1772

Farci P (2011) New insights into the HCV quasispecies and compartmentalization. *Semin Liver Dis* **31**: 356-374

Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzera A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter HJ (2000) The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* **288**: 339-344

Feigelstock DA, Mihalik KB, Feinstone SM (2011) Selection of hepatitis C virus resistant to ribavirin. *Virology* **8**: 402

Feld JJ (2012) Is there a role for ribavirin in the era of hepatitis C virus direct-acting antivirals? *Gastroenterology* **142**: 1356-1359

Feld JJ, Hoofnagle JH (2005) Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **436**: 967-972

Feld JJ, Lutchman GA, Heller T, Hara K, Pfeiffer JK, Leff RD, Meek C, Rivera M, Ko M, Koh C, Rotman Y, Ghany MG, Haynes-Williams V, Neumann AU, Liang TJ, Hoofnagle JH (2010) Ribavirin improves early responses to peginterferon through improved interferon signaling. *Gastroenterology* **139**: 154-162 e154

Feng DF, Doolittle RF (1996) Progressive alignment of amino acid sequences and construction of phylogenetic trees from them. *Methods in Enzymology* **266**: 368-382

Fernandez-Larsson R, O'Connell K, Koumans E, Patterson JL (1989) Molecular analysis of the inhibitory effect of phosphorylated ribavirin on the vesicular stomatitis virus in vitro polymerase reaction. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **33**: 1668-1673

Ferrer-Orta C, Sierra M, Agudo R, de la Higuera I, Arias A, Perez-Luque R, Escarmis C, Domingo E, Verdaguier N (2010) Structure of foot-and-mouth disease virus mutant polymerases with reduced sensitivity to ribavirin. *J Virol* **84**: 6188-6199

Fox EJ, Loeb LA (2010) Lethal mutagenesis: targeting the mutator phenotype in cancer. *Semin Cancer Biol* **20**: 353-359

Franklin TJ, Cook JM (1969) The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J* **113**: 515-524.

Friebe P, Bartenschlager R (2002) Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* **76**: 5326-5338

Friebe P, Boudet J, Simorre JP, Bartenschlager R (2005) Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol* **79**: 380-392

Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R (2001) Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* **75**: 12047-12057

Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J (2002) Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **347**: 975-982

Friedberg EC, Aguilera A, Gellert M, Hanawalt PC, Hays JB, Lehmann AR, Lindahl T, Lowndes N, Sarasin A, Wood RD (2006) DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)* **5**: 986-996

Gallei A, Pankraz A, Thiel HJ, Becher P (2004) RNA recombination in vivo in the absence of viral replication. *J Virol* **78**: 6271-6281

Gallois-Montbrun S, Chen Y, Dutartre H, Sophys M, Morera S, Guerreiro C, Schneider B, Mulard L, Janin J, Veron M, Deville-Bonne D, Canard B (2003) Structural analysis of the activation of ribavirin analogs by NDP kinase: comparison with other ribavirin targets. *Molecular pharmacology* **63**: 538-546

Galmozzi E, Aghemo A, Colombo M (2012) Eukaryotic initiation factor 5B: a new player for the anti-hepatitis C virus effect of ribavirin? *Med Hypotheses* **79**: 471-473

Gastaminza P, Dryden KA, Boyd B, Wood MR, Law M, Yeager M, Chisari FV (2010) Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J Virol* **84**: 10999-11009

Ge L, Zhang J, Zhou X, Li H (2007) Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl china virus. *J Virol* **81**: 5902-5907

Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**: R80

Gerotto M, Sullivan DG, Polyak SJ, Chemello L, Cavalletto L, Pontisso P, Alberti A, Gretsch DR (1999) Effect of retreatment with interferon alone or interferon plus ribavirin on hepatitis C virus quasispecies diversification in nonresponder patients with chronic hepatitis C. *J Virol* **73**: 7241-7247

Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB (2009) Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* **49**: 1335-1374

Gilbert BE, Knight V (1986) Biochemistry and clinical applications of ribavirin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **30**: 201-205

Gonzalez-Candelas F, Lopez-Labrador FX, Bracho MA (2011) Recombination in hepatitis C virus. *Viruses* **3**: 2006-2024

González-López C, Arias A, Pariente N, Gómez-Mariano G, Domingo E (2004) Preextinction viral RNA can interfere with infectivity. *J Virol* **78**: 3319-3324

González-López C, Gómez-Mariano G, Escarmís C, Domingo E (2005) Invariant aphthovirus consensus nucleotide sequence in the transition to error catastrophe. *Infection Genetics and Evolution* **5**: 366-374

Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D (2003) Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* **77**: 5487-5492

Goswami BB, Borek E, Sharma OK, Fujitaki J, Smith RA (1979) The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **89**: 830-836.

Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Lademann JB, Prentoe JC, Knudsen ML, Hoegh AM, Bukh J (2009) Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture



systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* **49**: 364-377

Goueslain L, Alsaleh K, Horellou P, Roingeard P, Descamps V, Duverlie G, Ciczora Y, Wychowski C, Dubuisson J, Rouille Y (2010) Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **84**: 773-787

Graci JD, Cameron CE (2002) Quasispecies, error catastrophe, and the antiviral activity of ribavirin. *Virology* **298**: 175-180.

Graci JD, Cameron CE (2008) Therapeutically targeting RNA viruses via lethal mutagenesis. *Future Virol* **3**: 553-566

Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM (1993) A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10583-10587

Grande-Pérez A, Gómez-Mariano G, Lowenstein PR, Domingo E (2005a) Mutagenesis-induced, large fitness variations with an invariant arenavirus consensus genomic nucleotide sequence. *J Virol* **79**: 10451-10459

Grande-Pérez A, Lazaro E, Lowenstein P, Domingo E, Manrubia SC (2005b) Suppression of viral infectivity through lethal defection. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 4448-4452

Grande-Pérez A, Sierra S, Castro MG, Domingo E, Lowenstein PR (2002) Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 12938-12943.

Greenbaum BD, Li OT, Poon LL, Levine AJ, Rabadan R (2012) Viral reassortment as an information exchange between viral segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 3341-3346

Gregori J, Salicru M, Domingo E, Sanchez A, Esteban JI, Rodriguez-Frias F, Quer J (2014) Inference with viral quasispecies diversity indices: clonal and NGS approaches. *Bioinformatics*

Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ (2003) The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* **535**: 34-38

**H**adziyannis SJ, Sette H, Jr., Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H, Jr., Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM (2004) Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Annals of internal medicine* **140**: 346-355

Henry SD, Metselaar HJ, Lonsdale RC, Kok A, Haagmans BL, Tilanus HW, van der Laan LJ (2006) Mycophenolic acid inhibits hepatitis C virus replication and acts in synergy with cyclosporin A and interferon-alpha. *Gastroenterology* **131**: 1452-1462

Hezode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, Goeser T, Bronowicki JP, Bourliere M, Gharakhanian S, Bengtsson L, McNair L, George S, Kieffer T, Kwong A, Kauffman RS, Alam J, Pawlotsky JM, Zeuzem S (2009) Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* **360**: 1839-1850

Hicks AL, Duffy S (2014) Cell Tropism Predicts Long-term Nucleotide Substitution Rates of Mammalian RNA Viruses. *PLoS Pathog* **10**: e1003838

- Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K (1993) Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* **67**: 4665-4675
- Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T (2010) Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res* **85**: 520-524
- Hoffman B, Liu Q (2011) Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals. *Liver Int* **31**: 1449-1467
- Hofmann WP, Polta A, Herrmann E, Mihm U, Kronenberger B, Sonntag T, Lohmann V, Schonberger B, Zeuzem S, Sarrazin C (2007) Mutagenic effect of ribavirin on hepatitis C nonstructural 5B quasispecies in vitro and during antiviral therapy. *Gastroenterology* **132**: 921-930
- Holland JJ, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S (1982) Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**: 1577-1585
- Horner SM, Gale M, Jr. (2013) Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nat Med* **19**: 879-888
- Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA (2003) Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7271-7276
- Huang L, Hwang J, Sharma SD, Hargittai MR, Chen Y, Arnold JJ, Raney KD, Cameron CE (2005) Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* **280**: 36417-36428
- Hultgren C, Milich DR, Weiland O, Sallberg M (1998) The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol* **79** (Pt 10): 2381-2391
- Barra KD, Pfeiffer JK (2009) Reduced ribavirin antiviral efficacy via nucleoside transporter-mediated drug resistance. *J Virol* **83**: 4538-4547
- Iranzo J, Perales C, Domingo E, Manrubia SC (2011) Tempo and mode of inhibitor-mutagen antiviral therapies: A multidisciplinary approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 16008-16013
- Isnard M, Granier M, Frutos R, Reynaud B, Peterschmitt M (1998) Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *J Gen Virol* **79**: 3091-3099
- Jin Z, Leveque V, Ma H, Johnson KA, Klumpp K (2013) NTP-mediated nucleotide excision activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E348-357
- Jirasko V, Montserret R, Lee JY, Gouttenoire J, Moradpour D, Penin F, Bartenschlager R (2010) Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog* **6**: e1001233

Jones CT, Catanese MT, Law LM, Khetani SR, Syder AJ, Ploss A, Oh TS, Schoggins JW, MacDonald MR, Bhatia SN, Rice CM (2010) Real-time imaging of hepatitis C virus infection using a fluorescent cell-based reporter system. *Nat Biotechnol* **28**: 167-171

Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**: 1577-1581

Jordan I, Briese T, Fischer N, Lau JY, Lipkin WI (2000) Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J Infect Dis* **182**: 1214-1217

Kanda T, Yokosuka O, Imazeki F, Tanaka M, Shino Y, Shimada H, Tomonaga T, Nomura F, Nagao K, Ochiai T, Saisho H (2004) Inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells: ribavirin induces mutagenesis in HCV RNA. *J Viral Hepat* **11**: 479-487

Kapoor A, Simmonds P, Gerold G, Qaisar N, Jain K, Henriquez JA, Firth C, Hirschberg DL, Rice CM, Shields S, Lipkin WI (2011) Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 11608-11613

Kapoor A, Simmonds P, Scheel TK, Hjelle B, Cullen JM, Burbelo PD, Chauhan LV, Duraisamy R, Sanchez Leon M, Jain K, Vandegrift KJ, Calisher CH, Rice CM, Lipkin WI (2013) Identification of rodent homologs of hepatitis C virus and pegiviruses. *MBio* **4**: e00216-00213

Kato T, Date T, Miyamoto M, Sugiyama M, Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Sugihara K, Hasegawa I, Fujiwara K, Ito K, Ozasa A, Mizokami M, Wakita T (2005) Detection of anti-hepatitis C virus effects of interferon and ribavirin by a sensitive replicon system. *J Clin Microbiol* **43**: 5679-5684

Kau A, Vermehren J, Sarrazin C (2008) Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol* **49**: 634-651

Kaul A, Stauffer S, Berger C, Pertel T, Schmitt J, Kallis S, Zayas M, Lohmann V, Luban J, Bartenschlager R (2009) Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog* **5**: e1000546

Kerr SJ (1987) Ribavirin induced differentiation of murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biochem* **77**: 187-194

Khan AG, Whidby J, Miller MT, Scarborough H, Zatorski AV, Cygan A, Price AA, Yost SA, Bohannon CD, Jacob J, Grakoui A, Marcotrigiano J (2014) Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature* **509**: 381-384

Kim MG, Moon JS, Kim EJ, Lee SH, Oh JW (2012) Destabilization of PDK1 by Hsp90 inactivation suppresses hepatitis C virus replication through inhibition of PRK2-mediated viral RNA polymerase phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **421**: 112-118

Kim S, Date T, Yokokawa H, Kono T, Aizaki H, Maurel P, Gondeau C, Wakita T (2014) Development of Hepatitis C Virus Genotype 3a Cell Culture System. *Hepatology* DOI: 10.1002/hep.27197

Kim Y, Lee C (2013) Ribavirin efficiently suppresses porcine nidovirus replication. *Virus Res* **171**: 44-53

Kirzinger MW, Stavrinides J (2012) Host specificity determinants as a genetic continuum. *Trends Microbiol* **20**: 88-93

Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM (2000) Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* **74**: 2046-2051

Kondo Y, Shimosegawa T (2013) Direct effects of hepatitis C virus on the lymphoid cells. *World J Gastroenterol* **19**: 7889-7895

Kong L, Giang E, Nieusma T, Kadam RU, Cogburn KE, Hua Y, Dai X, Stanfield RL, Burton DR, Ward AB, Wilson IA, Law M (2013) Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science* **342**: 1090-1094

Koutsoudakis G, Herrmann E, Kallis S, Bartenschlager R, Pietschmann T (2007) The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J Virol* **81**: 588-598

Kumar D, Abdulovic AL, Viberg J, Nilsson AK, Kunkel TA, Chabes A (2011) Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools. *Nucleic Acids Res* **39**: 1360-1371

Kumar D, Viberg J, Nilsson AK, Chabes A (2010) Highly mutagenic and severely imbalanced dNTP pools can escape detection by the S-phase checkpoint. *Nucleic Acids Res* **38**: 3975-3983

Kunkel TA, Alexander PS (1986) The base substitution fidelity of eucaryotic DNA polymerases. Mismatching frequencies, site preferences, insertion preferences, and base substitution by dislocation. *J Biol Chem* **261**: 160-166

Kwong AD, Najera I, Bechtel J, Bowden S, Fitzgibbon J, Harrington P, Kempf D, Kieffer TL, Koletzki D, Kukolj G, Lim S, Pilot-Matias T, Lin K, Mani N, Mo H, O'Rear J, Otto M, Parkin N, Pawlotsky JM, Petropoulos C, Picchio G, Ralston R, Reeves JD, Schooley RT, Seiwert S, Standing D, Stuyver L, Sullivan J, Miller V (2011) Sequence and phenotypic analysis for resistance monitoring in hepatitis C virus drug development: recommendations from the HCV DRAG. *Gastroenterology* **140**: 755-760

Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, Beaulieu P, Bolger G, Bonneau P, Bos M, Cameron DR, Cartier M, Cordingley MG, Faucher AM, Goudreau N, Kawai SH, Kukolj G, Lagace L, LaPlante SR, Narjes H, Poupert MA, Rancourt J, Sentjens RE, St George R, Simoneau B, Steinmann G, Thibeault D, Tsantrizos YS, Weldon SM, Yong CL, Llinas-Brunet M (2003) An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* **426**: 186-189

Lanford RE, Chavez D, Guerra B, Lau JY, Hong Z, Brasky KM, Beames B (2001) Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes. *J Virol* **75**: 8074-8081

Lange CM, Sarrazin C, Zeuzem S (2010) Review article: specifically targeted anti-viral therapy for hepatitis C - a new era in therapy. *Aliment Pharmacol Ther* **32**: 14-28

Lee HJ, Pawlak K, Nguyen BT, Robins RK, Sadee W (1985) Biochemical differences among four inosinate dehydrogenase inhibitors, mycophenolic acid, ribavirin, tiazofurin, and selenazofurin, studied in mouse lymphoma cell culture. *Cancer Res* **45**: 5512-5520

Lehmann KA, Bass BL (2000) Double-stranded RNA adenosine deaminases ADAR1 and ADAR2 have overlapping specificities. *Biochemistry* **39**: 12875-12884

Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, Weber PC (1999) Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* **6**: 937-943

Li J, Mahal SP, Demczyk CA, Weissmann C (2011) Mutability of prions. *EMBO Rep* **12**: 1243-1250

Li YP, Ramirez S, Gottwein JM, Scheel TK, Mikkelsen L, Purcell RH, Bukh J (2012a) Robust full-length hepatitis C virus genotype 2a and 2b infectious cultures using mutations identified by a systematic approach applicable to patient strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E1101-1110

Li YP, Ramirez S, Jensen SB, Purcell RH, Gottwein JM, Bukh J (2012b) Highly efficient full-length hepatitis C virus genotype 1 (strain TN) infectious culture system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 19757-19762

Lindenbach BD (2009) Measuring HCV infectivity produced in cell culture and in vivo. *Methods Mol Biol* **510**: 329-336

Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**: 623-626

Loeb LA (2011) Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nat Rev Cancer* **11**: 450-457

Loeb LA, Essigmann JM, Kazazi F, Zhang J, Rose KD, Mullins JI (1999) Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1492-1497

Loeb LA, Mullins JI (2000) Lethal mutagenesis of HIV by mutagenic ribonucleoside analogs. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**: 1-3

Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**: 110-113

López-Bueno A, Villarreal LP, Almendral JM (2006) Parvovirus variation for disease: A difference with RNA viruses? In *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* Vol. 299, pp 349-370.

Lorenz IC, Marcotrigiano J, Dentzer TG, Rice CM (2006) Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **442**: 831-835

Love RA, Brodsky O, Hickey MJ, Wells PA, Cronin CN (2009) Crystal structure of a novel dimeric form of NS5A domain I protein from hepatitis C virus. *J Virol* **83**: 4395-4403

Lowe JK, Brox L, Henderson JF (1977) Consequences of inhibition of guanine nucleotide synthesis by mycophenolic acid and virazole. *Cancer Res* **37**: 736-743

Lucas-Hourani M, Dauzonne D, Jorda P, Cousin G, Lupan A, Helynck O, Caignard G, Janvier G, Andre-Leroux G, Khiar S, Escriou N, Despres P, Jacob Y, Munier-Lehmann H, Tangy F, Vidalain PO (2013) Inhibition of pyrimidine biosynthesis pathway suppresses viral growth through innate immunity. *PLoS Pathog* **9**: e1003678

Lutchman G, Danehower S, Song BC, Liang TJ, Hoofnagle JH, Thomson M, Ghany MG (2007) Mutation rate of the hepatitis C virus NS5B in patients undergoing treatment with ribavirin monotherapy. *Gastroenterology* **132**: 1757-1766

Lyle JM, Bullitt E, Bienz K, Kirkegaard K (2002) Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* **296**: 2218-2222

Maag D, Castro C, Hong Z, Cameron CE (2001) Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J Biol Chem* **276**: 46094-46098

Mackenzie J (2005) Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic* **6**: 967-977

Mankouri J, Harris M (2011) Viruses and the fuel sensor: the emerging link between AMPK and virus replication. *Rev Med Virol* **21**: 205-212

Mankouri J, Tedbury PR, Gretton S, Hughes ME, Griffin SD, Dallas ML, Green KA, Hardie DG, Peers C, Harris M (2010) Enhanced hepatitis C virus genome replication and lipid accumulation mediated by inhibition of AMP-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 11549-11554

Manrubia SC, Escarmis C, Domingo E, Lazaro E (2005) High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies. *Gene* **347**: 273-282

Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gomez J (1992) Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* **66**: 3225-3229

Martinez MA, Vartanian JP, Wain-Hobson S (1994) Hypermutagenesis of RNA using human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and biased dNTP concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11787-11791

Marukian S, Jones CT, Andrus L, Evans MJ, Ritola KD, Charles ED, Rice CM, Dustin LB (2008) Cell culture-produced hepatitis C virus does not infect peripheral blood mononuclear cells. *Hepatology* **48**: 1843-1850

Marz M, Beerenwinkel N, Drosten C, Fricke M, Frishman D, Hofacker IL, Hoffmann D, Middendorf M, Rattei T, Stadler PF, Topfer A (2014) Challenges in RNA virus bioinformatics. *Bioinformatics*

Matloubian M, Kolhekar SR, Somasundaram T, Ahmed R (1993) Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **67**: 7340-7349

Maylin S, Martinot-Peignoux M, Moucari R, Boyer N, Ripault MP, Cazals-Hatem D, Giully N, Castelnau C, Cardoso AC, Asselah T, Feray C, Nicolas-Chanoine MH, Bedossa P, Marcellin P (2008) Eradication of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **135**: 821-829

McCown MF, Rajyaguru S, Le Pogam S, Ali S, Jiang WR, Kang H, Symons J, Cammack N, Najera I (2008) The hepatitis C virus replicon presents a higher barrier to resistance to nucleoside analogs than to nonnucleoside polymerase or protease inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**: 1604-1612

McGilvray I, Feld JJ, Chen L, Pattullo V, Guindi M, Fischer S, Borozan I, Xie G, Selzner N, Heathcote EJ, Siminovitch K (2012) Hepatic cell-type specific gene expression better predicts HCV treatment outcome than IL28B genotype. *Gastroenterology* **142**: 1122-1131 e1121

McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC, Jacobson IM, Sulkowski M, Kauffman R, McNair L, Alam J, Muir AJ (2009) Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* **360**: 1827-1838

McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B (2002) Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *Embo J* **21**: 3980-3988

McMullan LK, Grakoui A, Evans MJ, Mihalik K, Puig M, Branch AD, Feinstone SM, Rice CM (2007) Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2879-2884

Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL, Kneteman NM (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* **7**: 927-933

Merz A, Long G, Hiet MS, Brugger B, Chlanda P, Andre P, Wieland F, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R (2011) Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem* **286**: 3018-3032

Mikkelsen JG, Pedersen FS (2000) Genetic reassortment and patch repair by recombination in retroviruses. *J Biomed Sci* **7**: 77-99

Miyanari Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotohno K (2003) Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *J Biol Chem* **278**: 50301-50308

Moradpour D, Brass V, Bieck E, Friebe P, Gosert R, Blum HE, Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V (2004) Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **78**: 13278-13284

Moradpour D, Penin F, Rice CM (2007) Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* **5**: 453-463

Moreno H, Gallego I, Sevilla N, de la Torre JC, Domingo E, Martin V (2011) Ribavirin can be mutagenic for arenaviruses. *J Virol* **85**: 7246-7255

Moreno H, Grande-Perez A, Domingo E, Martín V (2012) Arenaviruses and lethal mutagenesis. Prospects for new ribavirin-based interventions. *Viruses* **4**: 2786-2805

Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N (2011) Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. *Virus Res* **157**: 61-70

Mudd JA, Leavitt RW, Kingsbury DT, Holland JJ (1973) Natural selection of mutants of vesicular stomatitis virus by cultured cells of *Drosophila melanogaster*. *J Gen Virol* **20**: 341-351

Muller WE, Maidhof A, Taschner H, Zahn RK (1977) Virazole (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide; a cytostatic agent. *Biochem Pharmacol* **26**: 1071-1075

**N**akabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **42**: 3858-3863

Neddermann P, Quintavalle M, Di Pietro C, Clementi A, Cerretani M, Altamura S, Bartholomew L, De Francesco R (2004) Reduction of hepatitis C virus NS5A

hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *J Virol* **78**: 13306-13314

Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 5269-5273

Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS (1998) Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **282**: 103-107

Ning Q, Brown D, Parodo J, Cattral M, Gorczynski R, Cole E, Fung L, Ding JW, Liu MF, Rotstein O, Phillips MJ, Levy G (1998) Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol* **160**: 3487-3493

Nishikura K (2010) Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem* **79**: 321-349

Nowak MA (1992) What is a quasispecies? *Trends In Ecol and Evol* **4**: 118-121

Ogle JW, Toltzis P, Parker WD, Alvarez N, McIntosh K, Levin MJ, Lauer BA (1989) Oral ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis. *J Infect Dis* **159**: 748-750

Ojosnegros S, Agudo R, Sierra M, Briones C, Sierra S, Gonzalez-Lopez C, Domingo E, Cristina J (2008) Topology of evolving, mutagenized viral populations: quasispecies expansion, compression, and operation of negative selection. *BMC Evol Biol* **8**: 207

Ojosnegros S, Perales C, Mas A, Domingo E (2011) Quasispecies as a matter of fact: viruses and beyond. *Virus Res* **162**: 203-215

Oldstone MB (2006) Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions. *Virology* **344**: 111-118

Ortega-Prieto AM, Sheldon J, Grande-Perez A, Tejero H, Gregori J, Quer J, Esteban JI, Domingo E, Perales C (2013) Extinction of hepatitis C virus by ribavirin in hepatoma cells involves lethal mutagenesis. *PLoS ONE* **8**: e71039

Otto GA, Puglisi JD (2004) The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* **119**: 369-380

Pages H, Aboyoun P, Gentleman R, DebRoy S (2012) Biostrings: String objects representing biological sequences, and matching algorithms. R package version 2.24.1.

Pan Q, de Ruiter PE, Metselaar HJ, Kwekkeboom J, de Jonge J, Tilanus HW, Janssen HL, van der Laan LJ (2012) Mycophenolic acid augments interferon-stimulated gene expression and inhibits hepatitis C Virus infection in vitro and in vivo. *Hepatology* **55**: 1673-1683

Pariente N, Airaksinen A, Domingo E (2003) Mutagenesis versus inhibition in the efficiency of extinction of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **77**: 7131-7138

Pariente N, Sierra S, Airaksinen A (2005) Action of mutagenic agents and antiviral inhibitors on foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* **107**: 183-193



- Pariante N, Sierra S, Lowenstein PR, Domingo E (2001) Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors. *J Virol* **75**: 9723-9730.
- Parker WB (2005) Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res* **107**: 165-171
- Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N (2003) The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6104-6108
- Pawlotsky JM (2000) Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology* **32**: 889-896
- Pawlotsky JM (2006) Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Current Topics in Microbiol and Immunol* **299**: 261-284
- Pawlotsky JM (2009) Therapeutic implications of hepatitis C virus resistance to antiviral drugs. *Therap Adv Gastroenterol* **2**: 205-219
- Pawlotsky JM, Germanidis G, Neumann AU, Pellerin M, Frainais PO, Dhumeaux D (1998) Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* **72**: 2795-2805
- Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheux D, Blum HE, Bartenschlager R, Moradpour D (2004) Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* **279**: 40835-40843
- Perales C, Agudo R, Domingo E (2009a) Counteracting quasispecies adaptability: extinction of a ribavirin-resistant virus mutant by an alternative mutagenic treatment. *PLoS One* **4**: e5554
- Perales C, Agudo R, Tejero H, Manrubia SC, Domingo E (2009b) Potential benefits of sequential inhibitor-mutagen treatments of RNA virus infections. *PLoS Pathog* **5**: e1000658
- Perales C, Beach NM, Gallego I, Soria ME, Quer J, Esteban JI, Rice C, Domingo E, Sheldon J (2013) Response of hepatitis C virus to long-term passage in the presence of alpha interferon: multiple mutations and a common phenotype. *J Virol* **87**: 7593-7607
- Perales C, Henry M, Domingo E, Wain-Hobson S, Vartanian J, P. (2011) Lethal mutagenesis of foot-and-mouth disease virus involves shifts in sequence space. *J Virol* **85**: 12227-12240
- Perales C, Iranzo J, Manrubia SC, Domingo E (2012) The impact of quasispecies dynamics on the use of therapeutics. *Trends Microbiol* **20**: 595-603
- Perales C, Mateo R, Mateu MG, Domingo E (2007) Insights into RNA virus mutant spectrum and lethal mutagenesis events: replicative interference and complementation by multiple point mutants. *J Mol Biol* **369**: 985-1000
- Pfeiffer JK, Kirkegaard K (2005a) Increased fidelity reduces poliovirus fitness under selective pressure in mice. *PLoS Pathogens* **1**: 102-110
- Pfeiffer JK, Kirkegaard K (2005b) Ribavirin resistance in hepatitis C virus replicon-containing cell lines conferred by changes in the cell line or mutations in the replicon RNA. *J Virol* **79**: 2346-2355
- Pfeiffer JK, Kirkegaard K (2006) Bottleneck-mediated quasispecies restriction during spread of an RNA virus from inoculation site to brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5520-5525

Pham TN, Coffin CS, Michalak TI (2010) Occult hepatitis C virus infection: what does it mean? *Liver Int* **30**: 502-511

Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, Abid K, Negro F, Dreux M, Cosset FL, Bartenschlager R (2006) Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7408-7413

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**: 938-941

Ploss A, Dubuisson J (2012) New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new treatment targets. *Gut* **61 Suppl 1**: i25-35

Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM (2009) Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**: 882-886

Pogolotti AL, Jr., Santi DV (1982) High-pressure liquid chromatography--ultraviolet analysis of intracellular nucleotides. *Anal Biochem* **126**: 335-345

Poli J, Tsaponina O, Crabbe L, Keszthelyi A, Pantesco V, Chabes A, Lengronne A, Pasero P (2012) dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *Embo J* **31**: 883-894

Poordad F, McCone J, Jr., Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, Jacobson IM, Reddy KR, Goodman ZD, Boparai N, DiNubile MJ, Sniukiene V, Brass CA, Albrecht JK, Bronowicki JP (2011) Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* **364**: 1195-1206

Popescu CI, Callens N, Trinel D, Roingeard P, Moradpour D, Descamps V, Duverlie G, Penin F, Heliot L, Rouille Y, Dubuisson J (2011) NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog* **7**: e1001278

Powdrill MH, Tchesnokov EP, Kozak RA, Russell RS, Martin R, Svarovskaia ES, Mo H, Kouyos RD, Gotte M (2011) Contribution of a mutational bias in hepatitis C virus replication to the genetic barrier in the development of drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 20509-20513

**Q**uer J, Martell M, Rodriguez A, Bosch A, Jardi R, Buti M, Esteban JI (2008) The impact of Rapid Evolution of Hepatitis Viruses, p. 303-350. *In* Origin and Evolution of Viruses. Domingo, E., Parrish, C. and Holland, J.J. (eds.). Elsevier, Oxford

Querenghi F, Yu Q, Billaud G, Maertens G, Treppe C, Zoulim F (2001) Evolution of hepatitis C virus genome in chronically infected patients receiving ribavirin monotherapy. *J Viral Hepat* **8**: 120-131

Quintavalle M, Sambucini S, Di Pietro C, De Francesco R, Neddermann P (2006) The alpha isoform of protein kinase CKI is responsible for hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation. *J Virol* **80**: 11305-11312

**R**amirez C, Gregori J, Buti M, Tabernero D, Camos S, Casillas R, Quer J, Esteban R, Homs M, Rodriguez-Frias F (2013) A comparative study of ultra-deep pyrosequencing and cloning to

quantitatively analyze the viral quasispecies using hepatitis B virus infection as a model. *Antiviral Res* **98**: 273-283

Rampazzo C, Miazzi C, Franzolin E, Pontarin G, Ferraro P, Frangini M, Reichard P, Bianchi V (2010) Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances. *Mutat Res* **703**: 2-10

Rankin JT, Jr., Eppes SB, Antczak JB, Joklik WK (1989) Studies on the mechanism of the antiviral activity of ribavirin against reovirus. *Virology* **168**: 147-158

Reed KE, Gorbalenya AE, Rice CM (1998) The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol* **72**: 6199-6206

Reed LJ, Muench H (1938) A simple method for estimating fifty per cent endpoint. *Am J Hyg* **27**: 493-497

Reiss S, Harak C, Romero-Brey I, Radujkovic D, Klein R, Ruggieri A, Rebhan I, Bartenschlager R, Lohmann V (2013) The lipid kinase phosphatidylinositol-4 kinase III alpha regulates the phosphorylation status of hepatitis C virus NS5A. *PLoS Pathog* **9**: e1003359

Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, Santarella-Mellwig R, Habermann A, Hoppe S, Kallis S, Walther P, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R (2012) Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* **8**: e1003056

Ruiz-Jarabo CM, Arias A, Baranowski E, Escarmís C, Domingo E (2000) Memory in viral quasispecies. *J Virol* **74**: 3543-3547

**S**akai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J (2003) The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11646-11651

Sakamoto H, Okamoto K, Aoki M, Kato H, Katsume A, Ohta A, Tsukuda T, Shimma N, Aoki Y, Arisawa M, Kohara M, Sudoh M (2005) Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nature chemical biology* **1**: 333-337

Salloum S, Wang H, Ferguson C, Parton RG, Tai AW (2013) Rab18 binds to hepatitis C virus NS5A and promotes interaction between sites of viral replication and lipid droplets. *PLoS Pathog* **9**: e1003513

Sanchez-Jimenez C, Olivares I, de Avila Lucas AI, Toledano V, Gutierrez-Rivas M, Lorenzo-Redondo R, Grande-Perez A, Domingo E, Lopez-Galindez C (2012) Mutagen-mediated enhancement of HIV-1 replication in persistently infected cells. *Virology* **424**: 147-153

Sarrazin C, Zeuzem S (2010) Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **138**: 447-462

Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* **21**: 5017-5025

Schaaper RM (1993) Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**: 23762-23765

Scheel TK, Gottwein JM, Mikkelsen LS, Jensen TB, Bukh J (2011) Recombinant HCV variants with NS5A from genotypes 1-7 have different sensitivities to an NS5A inhibitor but not interferon-alpha. *Gastroenterology* **140**: 1032-1042

Scheel TK, Rice CM (2013) Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med* **19**: 837-849

Scheidel LM, Durbin RK, Stollar V (1987) Sindbis virus mutants resistant to mycophenolic acid and ribavirin. *Virology* **158**: 1-7

Schuster P, Stadler PF (1999) Nature and evolution of early replicons. In *Origin and Evolution of Viruses*, Domingo E, Webster RG, Holland JJ (eds), pp 1-24. San Diego: Academic Press

Schwartz M, Chen J, Janda M, Sullivan M, den Boon J, Ahlquist P (2002) A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol Cell* **9**: 505-514

Seet BT, Johnston JB, Brunetti CR, Barrett JW, Everett H, Cameron C, Sypula J, Nazarian SH, Lucas A, McFadden G (2003) Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* **21**: 377-423

Severson WE, Schmaljohn CS, Javadian A, Jonsson CB (2003) Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J Virol* **77**: 481-488

Shanmugam S, Yi M (2013) Efficiency of E2-p7 processing modulates production of infectious hepatitis C virus. *J Virol* **87**: 11255-11266

Sheldon J, Beach NM, Moreno E, Gallego I, Pineiro D, Martinez-Salas E, Gregori J, Quer J, Esteban JI, Rice CM, Domingo E, Perales C (2014) Increased replicative fitness can lead to decreased drug sensitivity of hepatitis C virus. *J Virol*, in press.

Sierra M, Airaksinen A, Gonzalez-Lopez C, Agudo R, Arias A, Domingo E (2007) Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *J Virol* **81**: 2012-2024

Sierra S, Dávila M, Lowenstein PR, Domingo E (2000) Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis. Influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *J Virol* **74**: 8316-8323

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin IT, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A (2005) Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**: 962-973

Sintchak MD, Fleming MA, Futer O, Raybuck SA, Chambers SP, Caron PR, Murcko MA, Wilson KP (1996) Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cell* **85**: 921-930

Slavenburg S, Huntjens-Fleuren HW, Dofferhoff TS, Richter C, Koopmans PP, Verwey-Van Wissen CP, Drenth JP, Burger DM (2011) Ribavirin plasma concentration measurements in patients with hepatitis C: early ribavirin concentrations predict steady-state concentrations. *Ther Drug Monit* **33**: 40-44

Smith EC, Blanc H, Vignuzzi M, Denison MR (2013) Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog* **9**: e1003565

Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, Ma SK, Cheung CL, Raghvani J, Bhatt S, Peiris JS, Guan Y, Rambaut A (2009) Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* **459**: 1122-1125

Snell NJ (2001) Ribavirin-current status of a broad spectrum antiviral agent. *Expert Opin Pharmacother* **2**: 1317-1324

Sobrino F, Dávila M, Ortín J, Domingo E (1983) Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**: 310-318

Solé RV, Deisboeck TS (2004) An error catastrophe in cancer? *J Theor Biol* **228**: 47-54

Sookoian S, Castano G, Frider B, Cello J, Campos R, Flichman D (2001) Combined therapy with interferon and ribavirin in chronic hepatitis C does not affect serum quasispecies diversity. *Dig Dis Sci* **46**: 1067-1071

Spear PG, Eisenberg RJ, Cohen GH (2000) Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* **275**: 1-8

Stoker M, Macpherson I (1964) Syrian Hamster Fibroblast Cell Line BHK21 and Its Derivatives. *Nature* **203**: 1355-1357

Streeter DG, Witkowski JT, Khare GP, Sidwell RW, Bauer RJ, Robins RK, Simon LN (1973) Mechanism of action of 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 1174-1178

Stuyver LJ, Lostia S, Patterson SE, Clark JL, Watanabe KA, Otto MJ, Pankiewicz KW (2002) Inhibitors of the IMPDH enzyme as potential anti-bovine viral diarrhoea virus agents. *Antivir Chem Chemother* **13**: 345-352

Sumpter R, Jr., Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M, Jr. (2005) Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* **79**: 2689-2699

Suzuki A, Miyawaki Y, Okuyama E, Murata M, Ando Y, Kato I, Takagi Y, Takagi A, Murate T, Saito H, Kojima T (2013) Ribavirin-induced intracellular GTP depletion activates transcription elongation in coagulation factor VII gene expression. *Biochem J* **449**: 231-239

Swetina J, Schuster P (1982) Self-replication with errors. A model for polynucleotide replication. *Biophys Chem* **16**: 329-345

Tapia N, Fernandez G, Parera M, Gomez-Mariano G, Clotet B, Quinones-Mateu M, Domingo E, Martinez MA (2005) Combination of a mutagenic agent with a reverse transcriptase inhibitor results in systematic inhibition of HIV-1 infection. *Virology* **338**: 1-8

Team RDC (2012) R: A language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.: ISBN 3-900051-900007-900050, URL <http://www.R-project.org/>.

Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J (2008) Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* **4**: e1000032

Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM (2005) Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* **435**: 374-379

Thomas E, Feld JJ, Li Q, Hu Z, Fried MW, Liang TJ (2011) Ribavirin potentiates interferon action by augmenting interferon-stimulated gene induction in hepatitis C virus cell culture models. *Hepatology* **53**: 32-41

Thomas E, Ghany MG, Liang TJ (2012) The application and mechanism of action of ribavirin in therapy of hepatitis C. *Antivir Chem Chemother* **23**: 1-12

Timpe JM, Stamataki Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, Schwarz A, Desombere I, Roels GL, Balfe P, McKeating JA (2008) Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* **47**: 17-24

Toltzis P, O'Connell K, Patterson JL (1988) Effect of phosphorylated ribavirin on vesicular stomatitis virus transcription. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **32**: 492-497

Torres-Puente M, Cuevas JM, Jimenez-Hernandez N, Bracho MA, Garcia-Robles I, Carnicer F, del Olmo J, Ortega E, Moya A, Gonzalez-Candelas F (2007) Contribution of insertions and deletions to the variability of hepatitis C virus populations. *J Gen Virol* **88**: 2198-2203

Van Kuilenburg AB, Maring JG (2013) Evaluation of 5-fluorouracil pharmacokinetic models and therapeutic drug monitoring in cancer patients. *Pharmacogenomics* **14**: 799-811

Vandamme A, Witvrouw M, Pannecouque C, Balzarini J, Van Laethem K, Schmit J, Desmyter J, De Clercq E (2000) *Evaluating Clinical Isolates for Their Phenotypic and Genotypic Resistance Against Anti-HIV Drugs*, Vol. 24, Totowa, NJ: Humana Press Inc.

Vartanian JP, Meyerhans A, Sala M, Wain-Hobson S (1994) G→A hypermutation of the human immunodeficiency virus type 1 genome: evidence for dCTP pool imbalance during reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3092-3096

Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R (2006) Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**: 344-348

Vo NV, Young KC, Lai MMC (2003) Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase. *Biochemistry* **42**: 10462-10471

Volkenstein MV (1994) *Physical approaches to biological evolution*, Berlin: Springer-Verlag.

Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**: 791-796

Webster RG (1999) Antigenic variation in influenza viruses. In *Origin and Evolution of Viruses*, Domingo E, Webster RG, Holland JJ (eds), pp 377-390. San Diego: Academic Press

Weissmann C, Li J, Mahal SP, Browning S (2011) Prions on the move. *EMBO Rep* **12**: 1109-1117

Welker MW, Zeuzem S (2009) Occult hepatitis C: how convincing are the current data? *Hepatology* **49**: 665-675

- Williams R (2006) Global challenges in liver disease. *Hepatology* **44**: 521-526
- Willis RC, Carson DA, Seegmiller JE (1978) Adenosine kinase initiates the major route of ribavirin activation in a cultured human cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 3042-3044
- Wolk B, Sansonno D, Krausslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D (2000) Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* **74**: 2293-2304
- Wray SK, Gilbert BE, Knight V (1985a) Effect of ribavirin triphosphate on primer generation and elongation during influenza virus transcription in vitro. *Antiviral Res* **5**: 39-48
- Wray SK, Gilbert BE, Noall MW, Knight V (1985b) Mode of action of ribavirin: effect of nucleotide pool alterations on influenza virus ribonucleoprotein synthesis. *Antiviral Res* **5**: 29-37
- Yanagi M, St Claire M, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J (1999) In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2291-2295
- Ye L, Li J, Zhang T, Wang X, Wang Y, Zhou Y, Liu J, Parekh HK, Ho W (2012) Mycophenolate mofetil inhibits hepatitis C virus replication in human hepatic cells. *Virus Res* **168**: 33-40
- Yi M, Lemon SM (2003) 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* **77**: 3557-3568
- You S, Stump DD, Branch AD, Rice CM (2004) A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **78**: 1352-1366
- Young KC, Lindsay KL, Lee KJ, Liu WC, He JW, Milstein SL, Lai MM (2003) Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology* **38**: 869-878
- Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9294-9299
- Zhou S, Liu R, Baroudy BM, Malcolm BA, Reyes GR (2003) The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology* **310**: 333-342
- Zimmerman TP, Deeprose RD (1978) Metabolism of 5-amino-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide and related five-membered heterocycles to 5'-triphosphates in human blood and L5178Y cells. *Biochem Pharmacol* **27**: 709-716
- Zona L, Lupberger J, Sidahmed-Adrar N, Thumann C, Harris HJ, Barnes A, Florentin J, Tawar RG, Xiao F, Turek M, Durand SC, Duong FH, Heim MH, Cosset FL, Hirsch I, Samuel D, Brino L, Zeisel MB, Le Naour F, McKeating JA, Baumert TF (2013) HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host Microbe* **13**: 302-313





## **9. Anexos.**



**Anexo I. Mutaciones, cambio de aminoácido y su probabilidad (PAM 250) en los espectro de mutantes del gen NS5A de HCV pasados en ausencia o presencia de ribavirina<sup>a</sup>.**

HCV p4 Sin droga			HCV p5 Sin droga			HCV p4 R 75 µM			HCV p5 R 75 µM			HCV p4 R 100 µM		
Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250
C6298U	-	-	C6335U	-	-	C6281U	L5F	2	U6278C	V4R	2	C6286U	-	-
G6568A	-	-	C6529G	-	-	C6528U	T87I	0	C6335U	-	-	C6412U	-	-
U6673C	-	-	U6733C	-	-	G6543U	C92F	-4	C6364U	-	-	C6440U	P58S	I
U6679C	-	-	U6832C	-	-	A6636G	Q123R	I	C6595U	-	-	C6451U	-	-
G6693U	C142F	-4	U7044C	L259P	-3	C6676U	-	-	C6651U	S128F	-3	C6463U	-	-
A6807G	N180S	I	U7145C	S293P	I	U6781C	-	-	G6739A	-	-	C6757U	-	-
U6832C	-	-	A7150G	I294M	4	C6859U	-	-	G6766C	K166N	2	A6763G	-	-
A7072G	-	-	A7207G	-	-	U6980C	S238R	0	C6775U	-	-	A7008G	S247N	I
A7134G	D289G	I	U7386C	I373T	0	G6989A	A241T	I	G6797U	V177F	-I	A7011C	N248T	0
U7167A	L300H	-2	G7438A	-	-	C6993U	T242I	0	A6808U	K180N	I	G7064A	A266T	I
U7409C	S381P	I	U7624C	-	-	C7003U	-	-	C6888U	P207L	-3	G7087A	-	-
G7439C	A391P	I	A7655G	T463A	I	C7038G	A257G	I	G6913A	-	-	C7119U	A284V	0
U7462C	-	-				C7092U	P275L	-3	C6939U	P224L	-3	A7150G	I294M	2
A7540G	-	-				A7260G	Q331R	I	G6996A	C243Y	0	G7156A	-	-
A7655G	T463A	I				G7303U	K345N	I	C7042U	-	-	C7216U	-	-
G7658U	V464L	2				C7306U	-	-	U7047C	L260P	-3	A7366G	-	-
						G7364A	E366K	0	A7134G	D289G	I	C7370U	L368F	2
						G7415A	G383S	I	U7279A	-	-	G7402A	-	-
						G7441A	-	-	C7292U	P342S	I	C7449U	A394V	0
						C7447U	-	-	U7371A	L368H	-2	C7456U	-	-
						C7517U	P417S	I	U7524C	L419P	-3	C7481A	P405T	0
						G7565C	C433L	-6	G7564A	-	-	G7483U	P405T	0
						C7632A	T455N	0	G7665A	C466Y	0	C7605U	P446L	-3
												G7618A	-	-
												A7655G	T463A	I
<b>Mutaciones distintas</b>			<b>Mutaciones distintas</b>			<b>Mutaciones distintas</b>			<b>Mutaciones distintas</b>			<b>Mutaciones distintas</b>		
<b>16</b>			<b>12</b>			<b>23</b>			<b>23</b>			<b>25</b>		
<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>8 (50)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>7 (58)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>7 (30)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>9 (39)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>13 (52)</b>	
<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>8 (50)</b>		<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>5 (62)</b>		<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>16 (70)</b>		<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>14 (61)</b>		<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>12 (48)</b>	

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas son las de los pases 4 y 5 (indicados como p4 y p5) de las infecciones descritas en la Figura 5.1.3.2.

<sup>b</sup> La numeración de los residuos del genoma de HCV se corresponde con la del genoma JFH-I (número de acceso #AB047639). Los aminoácidos se representan según el código de una letra (explicado en Abreviaturas) y se numeran desde el aminoácido N-terminal al C-terminal.

<sup>c</sup> Número de mutaciones sinónimas y no sinónimas, y el porcentaje de cada una de ellas.



**Anexo 2. Mutaciones, cambio de aminoácido y su probabilidad (PAM 250) en los espectros de mutantes del gen NS5A de HCV pasado en ausencia o presencia de ribavirina analizados por secuenciación masiva<sup>a</sup>.**

HCV p4 Sin droga				HCV p4 R 75 µM			
Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Número de amplicón	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Número de amplicón
A6260G <sup>c</sup>	I259V	4	1	C6159A <sup>c</sup>	T225K	0	1
C6289U	-	-	1	G6172A <sup>c</sup>	-	-	1
C6298U	-	-	1	G6184A <sup>c</sup>	-	-	1
A6452G	N62D	2	2	C6187U <sup>c</sup>	-	-	1
C6633A	T122K	0	2	C6203A <sup>c</sup>	L240I	2	1
A6636G	Q123R	1	2	C6214U <sup>c</sup>	-	-	1
U6716C	F150L	1	2	A6260G <sup>c</sup>	I259V	4	1
U6733C	-	-	2	C6283U	-	-	1
U6741C	I158T	0	2, 3	A6319G	-	-	1
U6751C	-	-	2, 3	U6343A	-	-	1
C6757U	-	-	3	C6355U	-	-	1
U6781C	-	-	3	U6374G	F36V	-1	1
U6816C	-	-	3	G6406C	-	-	1
A7020G	D251G	1	4	C6411U	A48V	0	1
A7026G	D253G	1	4	C6412U	-	-	1
A7070G	T268A	1	4	A6416G	T50A	1	1
G7139A	E291K	0	4	C6430U	-	-	1
A7148C	I294L	2	4	C6451U	-	-	2
A7150G	I294M	2	4	A6452G	N62D	2	1, 2
C7155U	S296L	-3	4	C6473U	-	-	2
U7160C	C298R	-4	4	C6490U	-	-	2
G7161A	C298Y	0	4	C6505U	-	-	2
A7163G	M299V	2	4	C6517A	-	-	2
U7164G	M299T	-1	4	C6517U	-	-	2
U7164C	M299R	0	4	G6526A	-	-	2
U7183G	F305L	1	4	G6565U	-	-	2
U7201C	-	-	4	C6575U	P103S	1	2
G7228A	-	-	4, 5	C6576U	P103L	-3	2
C7297A	-	-	5	C6577U	-	-	2
A7299C	K344T	0	5	A6581G	N105D	2	2
U7342C	-	-	5	C6592U	-	-	2
C7583U	P439S	1	6	C6595U	-	-	2
C7586A	Q440K	1	6	A6596G	I110V	4	2
A7655G	T463A	1	6	G6607A	-	-	2
G7658U	V464L	2	6	G6610A	-	-	2
U7661C	C465R	-4	6	G6628A	-	-	2
U7661A	C465S	0	6	A6636G	Q123R	1	2
A7696G <sup>d</sup>	-	-	6	U6640C	-	-	2
				C6645U	S126L	-3	2
				C6676U	-	-	2
				C6680U	-	-	2
				U6733C	-	-	2
				G6748A	-	-	3
				G6779A	D171N	2	3
				U6781C	-	-	3
				G6784A	-	-	3
				G6802A	-	-	3
				C6803U	L179F	1	3
				C6826U	-	-	3
				C6843U	P192L	-3	3
				C6850U	-	-	3
				G6854A	A196T	1	3

				C6859U	-	-	3
				C6889U	-	-	3
				G6904A	-	-	3
				G6910A	-	-	3
				A6940G	-	-	3
				G6913A	-	-	4
				G6922A	-	-	4
				C6948U	<b>A227V</b>	0	4
				G6996A	<b>C243Y</b>	0	4
				C7000U	-	-	4
				C7003U	-	-	4
				C7015U	-	-	4
				A7020G	<b>D251G</b>	1	4
				A7026U	<b>D253V</b>	1	4
				G7034A	<b>D256N</b>	2	4
				C7039U	-	-	4
				U7047C	<b>L260P</b>	-3	4
				G7054A	-	-	4
				C7057U	-	-	4
				C7067U	<b>P270L</b>	-3	4
				A7080C	<b>E271A</b>	0	4
				U7082C	<b>S272P</b>	1	4
				A7101G	<b>D278G</b>	1	4
				A7134G	<b>D289G</b>	1	4
				G7139A	<b>E291K</b>	0	4
				A7148C	<b>I294L</b>	2	4
				A7150G	<b>I294M</b>	2	4
				C7155U	<b>S296L</b>	-3	4
				G7161A	<b>C298Y</b>	0	4
				A7163G	<b>M299V</b>	2	4
				U7164G	<b>M299T</b>	-1	4
				U7164C	<b>M299R</b>	0	4
				G7174U	<b>R302S</b>	0	4
				G7180C	-	-	4
				U7181C	<b>F305L</b>	1	4
				U7183G	<b>F305L</b>	1	4
				U7193C	-	-	4
				G7198U	-	-	4
				U7217C	<b>Y317H</b>	0	4
				G7228A	-	-	4, 5
				C7297A	-	-	5
				A7299C	<b>K344T</b>	0	5
				G7312A	-	-	5
				U7342C	-	-	5
				C7399U	-	-	5
				C7403G	<b>P379A</b>	1	5
				C7414U	-	-	5
				G7436A	<b>G390R</b>	-3	6
				G7441A	-	-	5, 6
				G7442A	<b>G392S</b>	1	5
				C7447U	-	-	5, 6
				C7450U	-	-	6
				C7455U	<b>S396F</b>	-3	5
				C7456A	-	-	5, 6
				G7457A	<b>G397S</b>	1	5, 6
				C7459U	-	-	6
				G7460A	<b>G398S</b>	1	5, 6
				C7464A	<b>P399Q</b>	0	5, 6
				C7464U	<b>P399L</b>	-3	5

				C7482U	<b>P405L</b>	-3	6
				G7484U	<b>A406S</b>	1	5, 6
				C7497G	<b>T410R</b>	-1	5, 6
				C7510U	-	-	6
				U7513C	-	-	6
				G7516A	<b>M416I</b>	2	5
				C7517U	<b>P417S</b>	1	6
				C7518U	<b>P417L</b>	-3	5, 6
				C7525A	-	-	5, 6
				U7556A	<b>S430T</b>	1	6
				G7564A	-	-	6
				C7605U	<b>P446L</b>	-3	6
				U7610C	<b>S448P</b>	1	6
				G7621A	-	-	6
				A7655G	<b>T463A</b>	1	6
				A7696G <sup>d</sup>	-	-	6
<b>Mutaciones distintas</b>	<b>38</b>			<b>Mutaciones distintas</b>	<b>127</b>		
<b>Sinónimas (%)<sup>e</sup></b>	<b>12 (32)</b>			<b>Sinónimas (%)<sup>e</sup></b>	<b>68 (54)</b>		
<b>No Sinónimas (%)<sup>e</sup></b>	<b>26 (68)</b>			<b>No Sinónimas (%)<sup>e</sup></b>	<b>59 (46)</b>		

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas son las del pase 4 (indicado como p4) de las infecciones a MOI inicial alta descritas en la Figura 5.1.3.1.

<sup>b</sup> . La numeración de los residuos del genoma de HCV se corresponde con la del genoma JFH-1 (número de acceso #AB047639). La región genómica analizada se sitúa entre el nucleótido 6152 y el 7725.

<sup>c</sup> La mutación y el cambio de aminoácido está en la región NS4B.

<sup>d</sup> La mutación y el cambio de aminoácido está en la región NS5B.

<sup>e</sup> Número de mutaciones sinónimas y no sinónimas, y el porcentaje de cada una de ellas.





**Anexo 3. Mutaciones, cambio de aminoácido y su probabilidad (PAM 250) en los espectro de mutantes del gen NS5A de HCV pasado en ausencia o presencia de ribavirina y guanosina<sup>a</sup>.**

HCV p3 Sin droga			HCV p3 Gua 200 µM			HCV p3 R 50 µM + Gua 200 µM			HCV p3 R 100 µM + Gua 200 µM		
Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250
A6452G	N62D	2	A6357U	K30I	-2	U6343C	-		U6269C	SIL	-3
A6455G	I63V	4	G6358U	K30I	-2	A6452G	N62D	2	C6270U	SIL	-3
C6632U	R122C	-4	G6400U	K44N	1	G6487A	-		U6347C	-	
G6641A	G125R	-3	G6420A	G51D	1	A6684G	K139R	3	A6452G	N62D	2
A6697G	-		A6452G	N62D	2	A6709G	-		G6511A	M81I	2
A6740G	I158V	4	U6474A	L69Q	-2	A6758U	T164S	1	A6587G	K107E	0
A6758U	T164S	1	G6523A	-		C6762U	P165L	-3	G6604A	-	
G6784A	-		A6540C	N91T	0	U6812C	Y182H	0	G6608A	A114T	1
A6840G	E191G	0	G6634A	-		U6832C	-		G6610A	-	
A6877U	-		G6641A	G125R	-3	C6948U	A227L	-2	G6628A	-	
U6980C	S238P	1	A6683G	K139E	0	A6998G	T244A	1	C6718U	-	
G7037A	A257T	1	A6696U	Q143L	-2	A7013G	T249A	1	G6734A	V156M	2
C7057U	-		A6758U	T164S	1	A7068G	Q267R	1	C6757U	-	
U7137A	L290H	-2	A6940G	-		G7087A	-		A6758U	T164S	1
U7137C	L290P	-3	A6998G	T244A	1	A7128G	E287G	0	C6820U	-	
A7150G	I294M	2	C7033U	-		A7153G	-		A6828U	Q187L	-2
A7163G	M299V	2	G7088A	V274M	2	U7167C	L300P	-3	C6833U	P189S	1
U7273C	-		U7137C	L290P	-3	U7201C	-		C6853U	-	
U7338G	V357G	-1	A7148G	I294V	4	A7252U	-		G6930A	G221E	0
C7410U	S381L	-3	A7150G	I294M	2	A7268U	T334S	1	A6958C	-	
A7533G	E422G	0	G7156U	-		C7294U	-		A6958U	-	
G7598A	V444I	4	U7164C	M299T	-1	G7300A	-		G6974A	A236T	1
A7655G	T463A	1	C7312U	-		A7302C	K345T	0	A7020C	D251A	0
			A7391G	D375G	1	C7307U	P347S	1	U7023C	V252A	0
			A7533G	E422G	0	C7318U	-		G7025A	D253N	2
			G7598A	V444I	4	C7319U	P351S	1	G7034A	D256N	2
						U7359C	I364T	0	A7035G	D256G	1
						A7433G	T389A	1	G7063A	-	
						A7533G	E422G	0	U7089C	V274A	0
						G7559A	D431N	2	U7103G	F279V	-1
						G7598A	V444I	4	A7115G	M283V	2
						G7640C	E458Q	2	C7119U	A284V	0
						A7655G	T463A	1	C7120U	-	
									C7132U	-	
									G7133A	D289N	2
									A7134G	D289G	1
									C7143U	P292L	-3

									A7150G	I294M	2
									U7160C	C298R	-4
									G7180A	-	
									C7192U	-	
									C7224U	P319L	-3
									C7239U	S324L	-3
									G7246A	-	
									C7296U	P343L	-3
									U7344C	L359P	-3
									C7373A	Q369K	1
									C7379U	-	
									G7382A	A372T	1
									C7407U	P380L	-3
									G7438A	-	
									C7440U	A391V	0
									G7461A	G398D	1
									C7482U	P405L	-3
									C7486U	-	
									G7516C	M416I	2
									C7521U	P418L	-3
									A7533G	E422G	0
									C7544U	P426S	1
									C7557A	S430Y	-3
									C7574G	Q436E	2
									C7582U	-	
									G7598A	V444I	4
									U7610C	S448P	1
									G7612A	-	
									U7624G	-	
									A7655G	T463A	1
<b>Mutaciones distintas</b>			<b>23</b>			<b>Mutaciones distintas</b>			<b>26</b>		
<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>			<b>5 (22)</b>			<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>			<b>6 (23)</b>		
<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>			<b>18 (78)</b>			<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>			<b>20 (77)</b>		
<b>Mutaciones distintas</b>			<b>33</b>			<b>Mutaciones distintas</b>			<b>67</b>		
<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>			<b>11 (33)</b>			<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>			<b>22 (33)</b>		
<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>			<b>22 (67)</b>			<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>			<b>45 (67)</b>		

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas son las del pase 3 (indicadas como p3) de las infecciones descritas en la Figura 5.1.5.1.

<sup>b</sup> La numeración de los residuos del genoma de HCV se corresponde con la del genoma JFH-I (número de acceso #AB047639). Los aminoácidos se representan según el código de una letra (explicado en Abreviaturas) y se numeran desde el aminoácido N-terminal al C-terminal.

<sup>c</sup> Número de mutaciones sinónimas y no sinónimas, y el porcentaje de cada una de ellas.

**Anexo 4. Mutaciones, cambio de aminoácido y su probabilidad (PAM 250) en los espectro de mutantes del gen NS5A de HCV pasado en ausencia o presencia de guanosina y ácido micofenólico<sup>a</sup>.**

HCV p3 Sin droga			HCV p3 Gua 200 µM			HCV p2 MPA 5 µM			HCV p3 MPA 5 µM + Gua 200 µM		
Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250	Mutación <sup>b</sup>	Cambio de aminoácido <sup>b</sup>	PAM 250
A6452G	N62D	2	A6357U	K30I	-2	C6283U	-		A6319G	-	
A6455G	I63V	4	G6358U	K30I	-2	C6335U	-		A6425G	M53V	2
C6632U	R122C	-4	G6400U	K44N	1	U6350C	F28L	2	A6452G	N62D	2
G6641A	G125R	-3	G6420A	G51D	1	G6361A	-		C6615U	S116L	-3
A6697G	-		A6452G	N62D	2	C6364A	-		A6696U	Q143L	-2
A6740G	I158V	4	U6474A	L69Q	-2	A6452G	N62D	2	C6835U	-	
A6758U	T164S	1	G6523A	-		C6492U	T75I	0	U6863G	L199V	2
G6784A	-		A6540C	N91T	0	G6604A	-		A6940G	-	
A6840G	E191G	0	G6634A	-		U6644A	S126T	1	A7020U	D251V	-2
A6877U	-		G6641A	G125R	-3	A6828G	Q187R	1	A7035G	D256G	1
U6980C	S238P	1	A6683G	K139E	0	C6900U	A211V	0	A7040G	N258D	2
G7037A	A257T	1	A6696U	Q143L	-2	G6961C	-		C7057U	-	
C7057U	-		A6758U	T164S	1	C6999U	T244I	0	U7078C	-	
U7137A	L290H	-2	A6940G	-		A7134G	E289G	0	A7115G	M283V	2
U7137C	L290P	-3	A6998G	T244A	1	U7160C	C298D	-5	U7164C	M299T	-1
A7150G	I294M	2	C7033U	-		G7161A	C298D	-5	U7167C	L300P	-3
A7163G	M299V	2	G7088A	V274M	2	A7172G	R302G	-3	A7327G	-	
U7273C	-		U7137C	L290P	-3	C7251U	P328L	-3	C7393U	-	
U7338G	V357G	-1	A7148G	I294V	4	U7255C	-		G7442A	G392S	1
C7410U	S381L	-3	A7150G	I294M	2	A7389G	K374R	3	G7495A	-	
A7533G	E422G	0	G7156U	-		G7465A	-		A7514G	M416V	2
G7598A	V444I	4	U7164C	M299T	-1	G7547A	D427N	2	A7533G	S422G	1
A7655G	T463A	1	C7312U	-		G7598A	V444I	4	G7598A	V444M	2
			A7391G	D375G	1	A7631C	T455P	0	A7600G	V444M	2
			A7533G	E422G	0	G7645A	-		A7631G	T455A	1
			G7598A	V444I	4	A7655G	T463A	1	A7652G	T462A	1
<b>Mutaciones distintas</b>	<b>23</b>		<b>Mutaciones distintas</b>	<b>26</b>		<b>Mutaciones distintas</b>	<b>26</b>		<b>Mutaciones distintas</b>	<b>26</b>	
<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>5 (22)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>6 (23)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>9 (35)</b>		<b>Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>8 (31)</b>	
<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>18 (78)</b>		<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>20 (77)</b>		<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>17 (65)</b>		<b>No Sinónimas (%)<sup>c</sup></b>	<b>18 (69)</b>	

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas son las del pase 3 (indicado como p3) de las infecciones descritas en la Figura 5.1.6.1.

<sup>b</sup> La numeración de los residuos del genoma de HCV se corresponde con la del genoma JFH-1 (número de acceso #AB047639). Los aminoácidos se representan según el código de una letra (explicado en Abreviaturas) y se numeran desde el aminoácido N-terminal al C-terminal.

<sup>c</sup> Número de mutaciones sinónimas y no sinónimas, y el porcentaje de cada una de ellas.



## **10. Artículo publicado.**

